

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



TESIS DOCTORAL

Melanoma cutáneo en Guatemala:
estudio morfológico inmunohistoquímico y detección de la mutación del gen BRAF

PRESENTADA POR

Elisa del Carmen Hernández López de Rodas

Director

José Luis Rodríguez Peralto

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
HOSPITAL 12 DE OCTUBRE
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA
DIRECTOR
Dr. JOSE LUIS RODRIGUEZ PERALTO
ESPAÑA

TESIS DOCTORAL

MELANOMA CUTANEO EN GUATEMALA: ESTUDIO MORFOLÓGICO
INMUNOHISTOQUIMICO Y DETECCIÓN DE LA MUTACION DEL GEN
BRAF

D. ELISA DEL CARMEN HERNANDEZ LOPEZ DE RODAS

RESUMEN

El Melanoma cutáneo representa el tipo de cáncer de mas alta mortalidad entre los canceres cutáneos, aumentando alrededor de 5 % por año, de estos, entre un 85 y un 90% presentan melanomas en estadios tempranos y curables⁴⁴. En todo el mundo cada año se diagnostican cerca de 160,000 casos nuevos de melanoma y de acuerdo con la OMS cada año fallecen 57,000 personas.³⁴ La incidencia de melanoma para Europa es de 6-14 por 100,000 habitantes, en USA de 10 a 25 por 100,000 habitantes y en Australia y Nueva Zelandia es de 50 a 60 por 100,000 habitantes.^{36,34}

El objetivo del presente estudio fue determinar la proporción de casos de melanoma maligno cutáneo por morfología, inmunohistoquímica y mutación del gen BRAF en pacientes con diagnóstico de Melanoma en dos centros de referencia (INCAN e INDERMA) en la ciudad de Guatemala (2006 a 2011), recolectándose 100 casos de melanoma, los cuales fueron caracterizados por edad, sexo y localización anatomía del tumor. La proporción de nuevos casos de melanoma para el periodo estudiado fue de 5.5/1,000 del total de canceres reportados para el periodo establecido.. El sexo más afectado fue el femenino (53.54%) El grupo de edad con mayor numero de casos fue entre 56 a 75 anos (44% de los casos). El Melanoma Lentiginoso Acral (59%) fue el mas frecuente, con un predominio de la localización de la extremidad inferior (71%) (pie, región periungueal y artejos). No se encontraron casos de Melanoma Lentigo Maligno en los casos estudiados. El nivel de Clark que predomino en la población fue el nivel III. El Espesor de Breslow en el 59 % de los casos fue mayor de 1mm. El patrón de crecimiento de los casos que predomino fue el crecimiento vertical con un 75 % . La determinación de la mutación del Gen BRAF se encontró en un 6 % de la población en Melanoma de Extensión Superficial(33%) y el Melanoma Nodular (50%). Sólo en un caso de melanomas de mucosas (17%) se demostró la mutación. En el Melanoma Lentigo Acral no se demostró la mutación.

ABSTRACT

Melanoma skin cancer is the one with the highest mortality over the skin cancers, increasing about 5% per year, of these, between 85 and 90% of melanomas occur in early stages and curables ⁴⁴ .. Worldwide, each year about 160,000 new cases of melanoma, are diagnosed . According to WHO about 57,000 people die each year. ³⁴ The incidence of melanoma in Europe is 6 to 14 per 100,000 population, in USA 10 to 25 per 100,000, and in Australia and New Zealand is 50 to 60 per 100,000 population.^{36.34}. The aim of this study was to determine the proportion of cases of **cutaneous malignant melanoma** by morphology, immunohistochemistry and BRAF gene mutation in patients with melanoma in two reference hospitals (INCAN and INDERMA) in Guatemala City (2006-2011) ,100 cases of melanoma were collected, characterized by age, sex and location of the tumor. The proportion of new cases of melanoma for the study period was 5.5 / 1,000 of all cancers reported for the period from 2006 to 2011 .. The most affected sex was female (53.54%), compare to male. The age group with the highest number of cases was between 56-75 years (44%). Acral lentiginous melanoma (59%) was the most frequent, with a predominance of the location of the lower extremity (71%) (foot, knuckles and periungual region). There were no cases of lentigo malignant melanoma. Clark level that prevailed in the population was the level III. The Breslow thickness in 59% of cases was greater than 1 mm. The growth pattern of the cases predominant was the vertical growth with 75%. The determination of the BRAF gene mutation was found in 6% of the population: superficial Spreading Melanoma (33%), Nodular Melanoma (50%). Only one case of Mucosal Melanoma (17%) showed the mutation. Acral Lentiginous Melanoma showed no mutation.

INDICES

INDICE DE CONTENIDOS.....

INDICE DE TABLAS.....

INDICE DE GRAFICAS.....

INDICE DE FIGURAS.....

INDICE

No.		
1.	INTRODUCCION	
1.1	GENERALIDADES	9
1.2	Estructura Anatómica de la piel	11
1.3	Fisiopatología del sistema Pigmentario	13
1.4	Melanoma	15
1.4.1	Epidemiología del Melanoma	16
2	OBJETIVOS	40
3	MATERIALES Y METODOS	41
3.1	Muestras Tisulares	41
3.2	Técnica de IHQ	43
3.3	Técnica de PCR-RT para detección de la mutación del gen BRAF	45
	Almacenamiento de Datos	47
3.4	Estudio Estadístico	47
3.5	Análisis Descriptivo	48
3.6	Variables a Estudio	49
3.7	Cronograma de Actividades	50
4	RESULTADOS	51
5	DISCUSION	69
5.1	Factores Epidemiológicos e Histopatológicos	69
5.2	Determinación de gen BRAF	73
5.3	Marcadores de Inmunohistoquímica	74
6	CONCLUSIONES	75
7	BIBLIOGRAFIA	76
8	ANEXOS	83

INDICE DE TABLAS

1.1	Fenotipos de piel	23
1.2	Tablas de la AJCC año 2009	34
1.3	Márgenes quirúrgicos de escisión recomendados en Melanoma	39
3.1	Anticuerpos Usados en Melanoma	43
3.2	Variables a estudio	49
3.3	Cronograma de trabajo	50
4.1	Distribución de casos de Melanoma por año	51
4.2	Distribución de casos de Melanoma por Diagnostico y año	54
4.3	Distribución de casos de Melanoma por grupos de edad	56
4.4	Diagnostico de Melanoma por grupos de edad	58

INDICE DE GRAFICAS

No.		Pag.
4.1	Distribución de Casos de Melanoma por Centro de Referencia	51
4.2	Distribución de Casos de Melanoma por año	52
4.3	Distribución de Casos de Melanoma por diagnostico	53
4.4	Distribución de Casos de Melanoma por año y diagnostico	53
4.5	Distribución de Casos de Melanoma por sexo	54
4.6	Distribución de Casos de Melanoma por edad	55
4.7	Distribución de Casos de Melanoma localización anatómica	57
4.8	Distribución de Casos de Melanoma por diagnostico	57
4.9	Distribución de Casos de Melanoma por nivel de Clark	59
4.1	Distribución de Casos de Melanoma por espesor de Breslow	59
4.11	Distribución de Casos de Melanoma por patrón de crecimiento	60
4.12	Distribución de Casos de Melanoma por diagnostico y patrón de crecimiento	61
4.13	Distribución de Casos de Melanoma por presencia de ulcera	61
4.14	Distribución de Casos de Melanoma por diagnostico y presencia de ulcera	62
4.15	Distribución de Casos de Melanoma por presencia de mitosis	63
4.16	Distribución de Casos de Melanoma por presencia de mitosis y diagnostico	63
4.17	Distribución de Casos de Melanoma por diagnostico y presencia de metástasis	64
4.18	Distribución de Casos de Melanoma por diagnostico y presencia de metástasis	65
4.19	Determinación de la mutación del gen BRAF	66
4.2	Distribución de Casos de Melanoma por presencia de mutación del gen BRAF	67
4.21	Distribución de Casos de Melanoma por presencia de mutación del gen BRAF y diagnostico	67

INDICE DE FIGURAS

No.		Pag.
1.1	Estudio Histológico de la Piel	11
1.2	Estratos de la piel	12
1.3	Desarrollo Embriológico de la piel	11
1.4	Síntesis de la melanina	12
1.5	Desarrollo embriológico de los Melanocitos	13
1.6	Progresión del Melanoma	18
1.7	Melanoma de extensión superficial	15
1.8	Melanoma Nodular	18
1.9	Melanoma Lentiginoso Acral	19
1.1	Melanoma Mucoso	19
1.11	Mecanismos de Resistencia apoptoticas MEK	20
1.12	Principales Vías Implicadas en el Melanoma	20
1.13	Frecuencia de Alteraciones Genéticas en BRAF, NRAS Y KIT	29
1.14	Subtipos de Melanoma	30
1.15	Nivel de Clark y Breslow	31
3.1	Procesamiento de Tejidos	42
3.2	Cortes de Tejidos	42
3.3	Autostainer para Tinción de Inmunohistoquímica	44
3.4	Esquema básico de Tinción de Inmunohistoquímica	44
3.5	Extracción de ADN en bloques de parafina para PCR	47
8.1	Cortes Histológicos con H & E	83
8.2	Cortes Histológicos con H & E	84
8.3	Cortes Histológicos con H & E	85
8.4	Cortes Histológicos con H & E	86
8.5	Cortes Histológicos con H & E e Inmunohistoquímica	87
8.6	Cortes Histológicos con H & E e Inmunohistoquímica	88

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES

En los últimos años se ha incrementado progresivamente el interés acerca del melanoma, un tipo altamente agresivo y potencialmente letal de cáncer de piel. Entre un 85 y un 90 % de los individuos con se presentan en estadios tempranos y curables⁴⁴. Su incidencia va en aumento en gran número de países. La supervivencia a cinco años de los casos con melanomas primarios localizados recientemente diagnosticados (AJCC estadios I y II) es de aproximadamente un 80%, comparada con un 35% cuando los ganglios linfáticos están comprometidos (AJCC estadio III). Cuando existen metástasis a distancia la supervivencia a cinco años desciende al 10%^{57,85}. En los últimos años ha existido un crecimiento exponencial de los casos melanoma, en varios países europeos. El aumento de incidencia anual supera el 2%.^{57,85} El riesgo de desarrollar un melanoma en un individuo nacido en la actualidad es del 1,88% lo que equivale a que una de cada 53 personas desarrollará un melanoma a lo largo de su vida.⁵⁷ 1 melanoma representa el 2,5% de todos los canceres y es responsable del 1-2% de las muertes por cáncer. El melanoma es la causa más frecuente de muerte entre las enfermedades cutáneas, supone un 4% de todos los cánceres cutáneos. El 41% de los melanomas se diagnostican antes de los 55 años, siendo este un cáncer muy importante en cuanto a la disminución de esperanza de vida en los pacientes. En todo el mundo cada año se diagnostican cerca de 160,000 casos nuevos de melanoma. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, cada año ocurren cerca de 57,000 muertes relacionadas con el melanoma. A pesar del aumento de la incidencia de melanoma, la mortalidad por este tumor es estable, sugiriendo que la mayor incidencia se debe al diagnóstico de lesiones de pequeño tamaño con mejor evolución. Es especialmente llamativo el rápido aumento de la incidencia en mujeres de menos de 40 años, grupo en el cual ha superado el cáncer de mama, siendo el cáncer más prevalente.³⁶ En el desarrollo de melanoma existen factores genéticos, familiares y ambientales. Los factores familiares y genéticos incluyen el fototipo de piel, el número de nevus melanocíticos, la presencia de nevus atípicos y la historia familiar de cáncer cutáneo. Dentro de los factores ambientales y también relacionados con los factores familiares están la exposición a radiación ultravioleta, la disminución de la capa de ozono, enfermedades o medicaciones que asocien inmunosupresión y el estatus económico³⁶. La Academia Americana de Dermatología reporto un incremento de la incidencia de cáncer de piel de 150% entre

1973 y 2005 y en relación al melanoma, aumentó la incidencia del 10% del 2004 al 2005. En Guatemala el cáncer de piel ocupa el tercer lugar en la frecuencia. En los registros observados en el INDERMA comprendidos entre Enero del 2003 hasta Diciembre del 2007, de 38,982 primeras consultas 401 correspondieron a cáncer de piel con una prevalencia del melanoma de 0.4 por cada 1000⁴¹. Por otro lado en los registros hospitalarios observados en el INCAN del año 2004 se observó una prevalencia de casos de 1.5%⁴⁰. En ambos géneros se reportaron casos a partir de los 30 años con una prevalencia en la población masculina a partir de los 65 años.

En el presente estudio se pretende hacer un análisis de una serie de casos de melanoma de la población de Guatemala, localizado en cara, tronco y acrales para determinar la mutación del gen BRAF por medio de técnicas de patología molecular y con el fin último de utilizarlo para el tratamiento y manejo terapéutico de estos pacientes. Pudiendo en un futuro implementar de forma rutinaria dichas técnicas de patología molecular en Guatemala.

1.2 ESTRUCTURA ANATÓMICA DE LA PIEL

La piel ha sido considerada en las últimas décadas por diversos estudios un órgano complejo, el más grande del cuerpo humano, en el que interacciones moleculares y celulares regulan respuestas cruciales a nuestro entorno. La piel esta formada por una capa de epidermis, una dérmica y una capa profunda llamada hipodermis. (Fig.1.1)

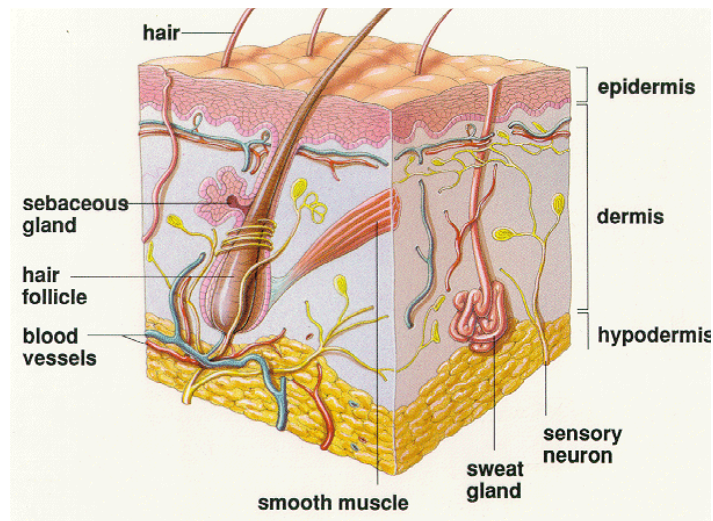


Figura 1.1. Estructura Anatómica de la piel.

La capa epidérmica se subdivide en 4 a 5 estratos del más superficial al más profundo:

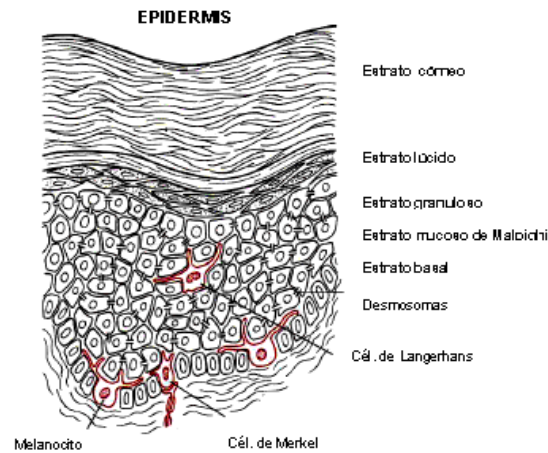
Estrato Corneo

Estrato Lucido (presente únicamente en piel gruesa)

Estrato granuloso

Estrato Espinoso

Estrato germinativo o basal



Adaptado de Cutaneous Medicine and Surgery. Kenneth A. Arndt, MD.

Figura. 1.2. Estratos de la piel.

La piel tiene su origen embriológico del ectodermo y mesodermo, siendo la epidermis y sus componentes de origen ectodérmico y la dermis e hipodermis de origen mesodérmico. Los melanocitos se originan en la cresta neural²³.

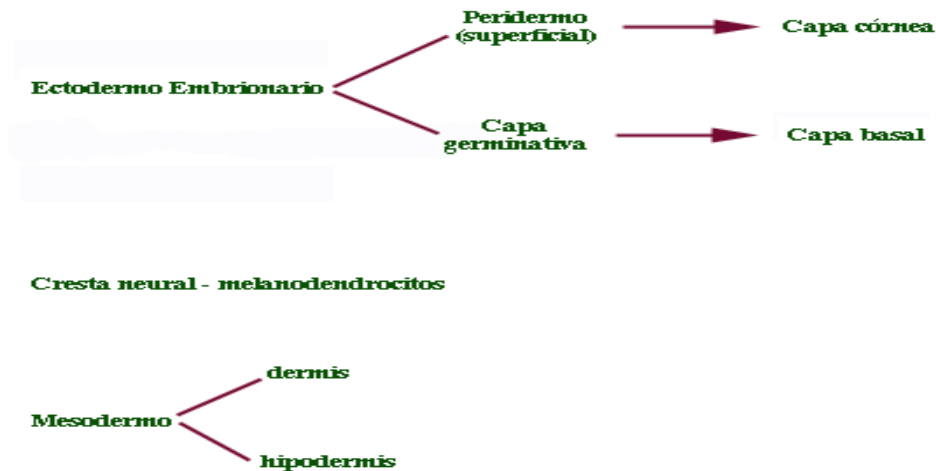


Figura. 1.3. Desarrollo embriológico de la piel a partir de las capas germinativas.

Igual que otros órganos la piel está formada por varios tipos y estructuras celulares interdependientes que colaboran en el plano funcional siendo estos las células epiteliales escamosas o queratinocitos los que participan en la biosíntesis de moléculas solubles (citocinas) que regulan a las células adyacentes de la epidermis y las de la

dermis. Los Melanocitos en el interior de la epidermis son responsables de la producción de melanina, un pigmento marrón que protege frente a la radiación ultravioleta (UV) potencialmente nociva de la luz solar²³.

Las células dendríticas o de Langerhans localizadas en la epidermis son las que interaccionan con el sistema inmunitario mediante migración a los ganglios linfáticos regionales. Los linfocitos otro grupo de células que pertenecen al sistema inmune y que expresan linfocitos T CD4 y CD8 y que son de importancia frente a enfermedades de tipo infeccioso e inflamatorio²³.

1.3 FISILOGIA DEL SISTEMA PIGMENTARIO

El mayor determinante del color de la piel y los anejos cutáneos es la actividad secretora de melanina por parte de los melanocitos localizados en la capa basal de la epidermis y el bulbo de los folículos pilosos. Las melaninas son los pigmentos especializados que no pertenecen a ninguna clase bioquímica conocida, sino que constituye un conjunto de moléculas afines con diferentes grados de polimerización y oxidación, que permiten clasificarlas en dos grandes grupos: eumelaninas y feomelaninas⁸⁴.

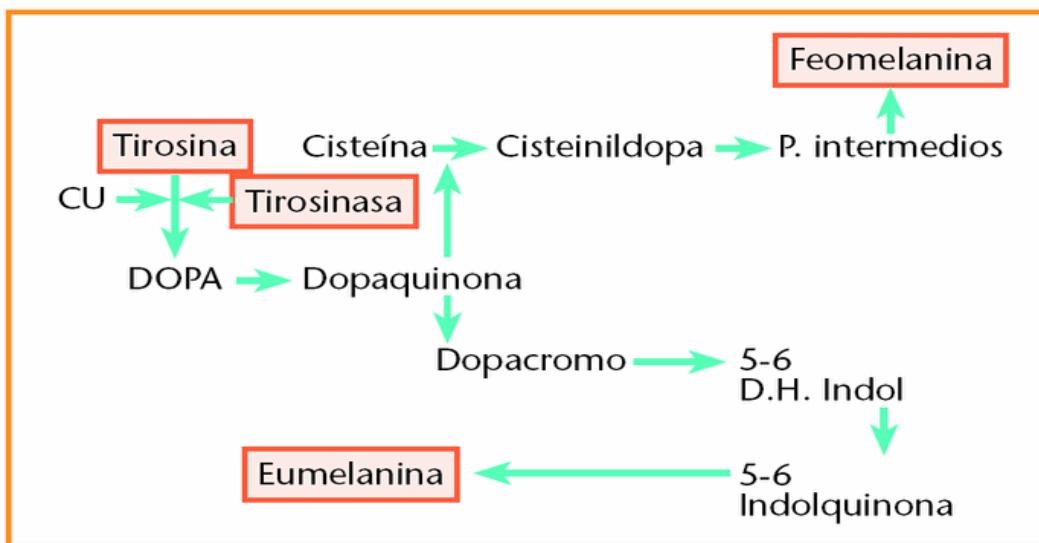


Figura 1.4. Síntesis de melanina.

La síntesis de la melanina consta de una serie de reacciones enzimáticas que tienen lugar en el interior de unas organelas especializadas llamadas melanosomas. La tirosinasa, la TRP-1 y la TRP-2 son las enzimas más importantes entre las que intervienen en la melanogénesis. La tirosinasa transforma la tirosina en 3-4 DOPA, y

posteriormente, convierte ésta en dopaquinona. A continuación, la TRP-1 y TRP-2 intervienen en la síntesis de eumelanina, mientras que la feomelanina se obtiene mediante la incorporación de derivados sulfatados por una vía anabólica alternativa⁸⁴. (Fig.1.4)

La biosíntesis de los melanosomas es un proceso complejo que tiene lugar cerca del núcleo del melanocito, y en el que intervienen determinadas proteínas como Pmel-17 o AP-1 y AP-3². A medida que se va produciendo su maduración, los melanosomas son transportados hacia el extremo distal de las dendritas melanocíticas, desde donde serán transferidos a los queratinocitos⁸⁵.

La pigmentación melánica está predeterminada genéticamente, y es regulada tanto por la radiación ultravioleta (UV) como por diversos factores químicos. La radiación UV, además de estimular un aumento en el número de melanocitos y sus dendritas, es el principal estímulo para la melanogénesis. Actúa tanto de forma directa sobre los melanocitos, aumentando la expresión y la actividad de la tirosinasa, como de forma indirecta, mediante la inducción de la secreción de factores activadores de la melanogénesis por parte de los queratinocitos y los melanocitos. Estos activadores de la melanogénesis son la hormona estimulante del melanocito alfa (MSH- α), la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y el óxido nítrico (NO)³⁸.

La MSH- α , al igual que la ACTH, son hormonas polipeptídicas derivadas de la división de la proopiomelanocortina (POMC). La MSH- α aumenta la melanogénesis estimulando la actividad de las enzimas tirosinasa, TRP-1 y TRP-2, mediante su unión a un receptor transmembrana expresado en la superficie de los queratinocitos, el receptor de la melanocortina-1 (MC1R en la literatura inglesa). En el ser humano, el fenotipo pelirrojo se asocia a ciertas variedades alélicas del receptor MC1R que implican una afinidad menor de este receptor por la MSH- α ⁹. Estos hallazgos sugieren que la MSH- α participaría en la melanogénesis humana favoreciendo la síntesis preferente de eumelanina frente a feomelanina⁷⁵.

La síntesis de melanina en el ser humano, además de determinar la pigmentación cutánea constitutiva o color de piel, y la pigmentación facultativa o capacidad para broncearse, tiene un papel fotoprotector muy importante, sugerida por la baja incidencia de cáncer cutáneo y fotodermatitis en personas de piel oscura. La melanina actúa mediante dos mecanismos: de forma directa, como un filtro solar que difracta y/o refleja la radiación UV, a través de un fenómeno de reagrupamiento (camping) de los melanosomas al recibir la radiación UV, situándose por encima del ADN de los

queratinocitos y melanocitos; y de forma indirecta, neutralizando los radicales libres y otras sustancias químicas producidas por los rayos UV. Sin embargo, la potencia fotoprotectora de la melanina es pequeña, estimándose similar a la de un factor de protección solar de 1,5-2, lo que supone una neutralización del 40-50 % de los rayos UV ¹¹. Además, la feomelanina, tras ser estimulada por la radiación UV, puede generar radicales libres con efectos mutágenos y daño tisular ^{2,81}.

1.4 MELANOMA

Los tumores malignos que se derivan de las células melanocíticas de la piel se denominan Melanomas. La mayoría de los melanomas se localizan en la piel y menos frecuentemente en mucosas, pero dado que los melanocitos migran desde la cresta neural, pueden observarse melanomas en otras localizaciones como retina y meninges donde también migran los melanocitos. Los melanocitos durante el desarrollo embriológico se diferencian hacia melanoblastos y migran hacia la piel (fig. 1.5). Tras alcanzar la dermis migran a la epidermis o el folículo piloso y se diferencian hacia melanocitos epidérmicos, foliculares, o se quedan en la dermis ².

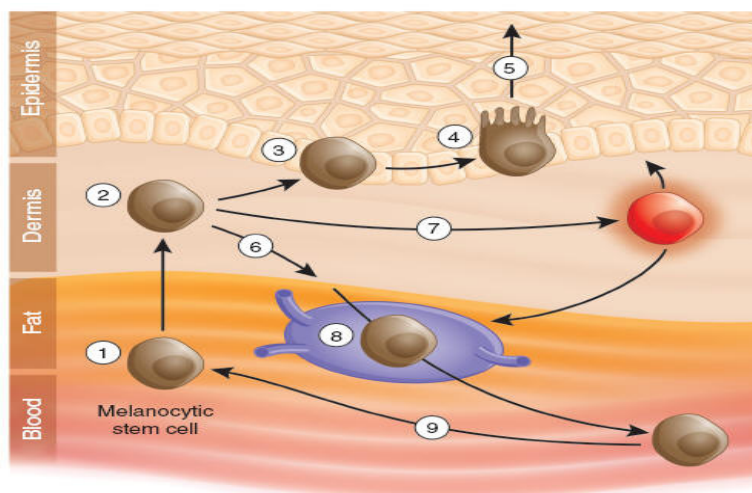


Figura 1.5. Desarrollo embriológico de los melanocitos

Las funciones de los melanocitos epidérmicos es la de producir melanina y transferirla a los queratinocitos que los rodean. Pueden dar lugar a uno de los tumores más frecuentes del organismo: los nevus melanocíticos. El melanoma se puede originar de dos formas. La primera, lesiones de novo y la segunda a partir de un nevus que inicialmente se transforma en nevus displásico y posteriormente en melanoma. El melanoma resultaría de la acumulación de mutaciones en genes involucrados en la regulación, proliferación, diferenciación y apoptosis celular. La teoría de la progresión

de lesiones melanocíticas se basa en el acumulo de defectos genéticos que se relacionan con los diferentes niveles de diferenciación ².

1.4.1 EPIDEMIOLOGIA DEL MELANOMA

En los últimos años ha existido un crecimiento exponencial de los casos de melanoma, en varios países europeos el aumento de incidencia anual supera el 2%. Sin embargo la incidencia de melanoma esta aumentando con más de 60,000 casos anuales y más de 8,000 muertes en USA en el 2008 ⁸⁰. El riesgo de desarrollar un melanoma en un individuo nacido en la actualidad es del 1.88% lo que equivale a que uno de cada 53 personas desarrollará un melanoma a lo largo de su vida. ² El melanoma representa el 2,5% de todos los canceres y es responsable del 1-2% de las muertes por cáncer. ² El melanoma es la causa más frecuente de muerte entre las enfermedades cutánea, supone un 4% de todos los cánceres cutáneos pero es la causa del 80% de las muertes por cáncer cutáneo. El 41% de los melanomas se diagnostican antes de los 55 años, siendo este un cáncer muy importante en relación a la reducción en la esperanza de vida de los pacientes. A pesar del aumento de la incidencia de melanoma, la mortalidad por este tumor es estable, sugiriendo que la mayor incidencia se debe al diagnóstico de lesiones de pequeño tamaño de buena evolución. Es especialmente llamativo el rápido aumento de la incidencia en mujeres de menos de 40 años, grupo en el cual ha pasado al cáncer de mama, siendo el cáncer más prevalente ^{2,26}.

En el desarrollo de melanoma existen factores genéticos, familiares y ambientales. Los factores familiares y genéticos incluyen el fototipo de piel, el número de nevus melanocíticos, la presencia de nevus atípicos y la historia familiar de cáncer cutáneo. Dentro de los factores ambientales están la exposición a radiación ultravioleta, la disminución de la capa de ozono, enfermedades o tratamientos que inducen inmunosupresión y el estatus económico⁶. El melanoma puede surgir tanto de los melanocitos (o de sus células madres) de la piel normal, como de ciertas lesiones precursoras (nevo displásico o atípico, nevo melanocítico congénito gigante, etc.). Se reconocen cuatro variedades clínico-patológicas principales: el melanoma lentigo maligno (MLM), el melanoma extensivo superficial (MES), el melanoma lentiginoso acral (MLA) y el melanoma nodular (MN). El tipo de melanoma mas frecuente que se reporta nivel mundial es el melanoma de extensión superficial. ⁴⁹

1.4.2 Modelo de Progresión tumoral

Clark y Elder ¹⁶ establecieron un modelo de progresión tumoral por etapas a través de lesiones clínicas fácilmente reconocibles. Dicho modelo es solo conceptual y no indica que una lesión melanica siga las diferentes etapas de progresión, ya que muchas de ellas comienzan de novo como benignas o malignas.⁵⁴ Los melanomas se inician en la epidermis con la proliferación de melanocitos en la unión dermoepidérmica y de forma gradual presentan un crecimiento intraepidérmico para afectar a toda la epidermis que corresponde al crecimiento radial e inclusive pueden afectar la dermis superficial. Cuando inician la fase de crecimiento vertical, rompen la unión dermoepidérmica y pasan a invadir la dermis papilar, reticular y tejido graso subcutáneo. Se ha desarrollado un modelo de neoplasias melanocíticas basado en la teoría de la célula madre. En este modelo se apoya la migración a la epidermis de un precursor dérmico. Los melanomas **in situ** o de bajo riesgo serían melanomas con una alta atracción por la epidermis por lo que las células migrarían hacia esta localización minimizando la migración desde el tejido. Si se acumulan mutaciones adicionales en el tumor (debidas a inestabilidad genómica) las células de melanoma crecerían de forma más independiente y tendrían más capacidad de invadir las porciones profundas de la dermis y otros tejidos. En este modelo se describen diferentes etapas, que no suelen ser consecutivas

1. La primera y más común lesión melanica es una proliferación focal en la base de la epidermis de los melanocitos normales. Clínicamente se observa una lesión redondeada y pigmentada: Nevus melanocítico adquirido común. La gran mayoría de estos nevus maduran en profundidad lipomizandose o bien neurotizándose. (Diferenciación schwanniana) ²⁴.

2. En algunos casos se observa crecimiento intraepidérmico de los melanocitos persistentes, con diferenciación aberrante: nevus melanocítico con hiperplasia melanocítica lentiginosa. Posteriormente aparecen melanocitos atípicos de gran tamaño, con núcleos hiper cromáticos y citoplasmas anchos, se origina un nevus displásico.

3. Radial: aquella proliferación celular que se extiende a través de la epidermis y unión dermoepidérmica; se incluye también en esta fase la presencia de células tumorales en la dermis papilar que no tengan actividad mitótica. En general, los tumores en fase

crecimiento radial no se asocian a metástasis. Forman pequeños nidos (no mas de 15 células) sin atípia celular ni capacidad de metástasis.

4. En la fase de crecimiento vertical, el tumor invade la dermis con capacidad de producir metástasis linfáticas o sanguíneas.

5. Fase de Melanoma Metastático, las células melánicas malignas se desplazan por el torrente sanguíneo o linfático a estructuras viscerales alejadas. ⁴⁶ (Fig 1.6)

Índice mitótico.

Se define como coeficiente del N° de células en mitosis/ N° total de células x mm². Aceptado actualmente como factor pronóstico independiente; algunos autores le atribuyen mayor importancia que la ulceración como factor pronóstico. ⁴⁶

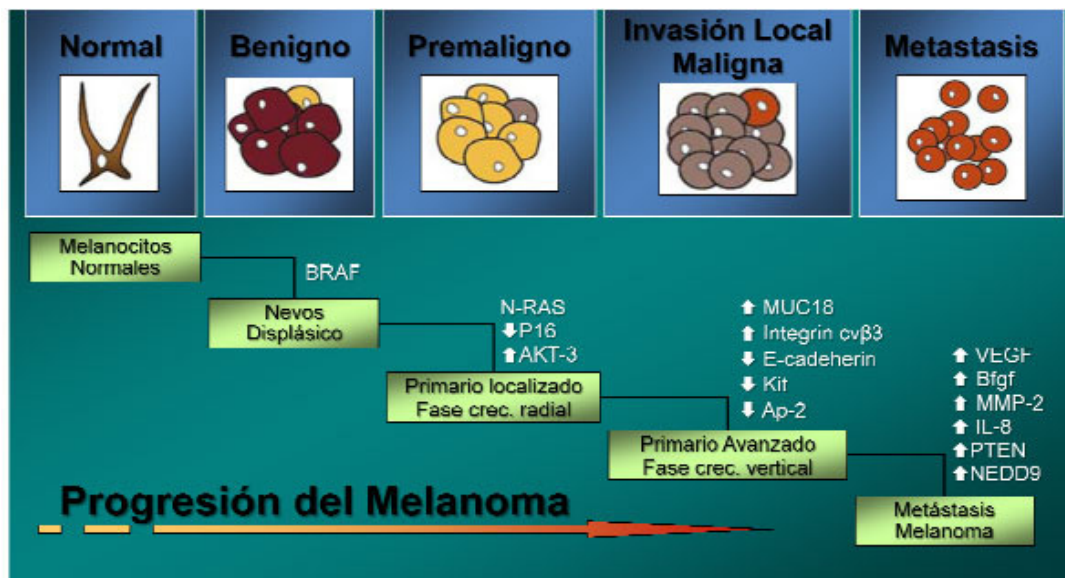


Figura 1.6. Progresión del Melanoma

1.4.3 Formas de Melanoma: clásicamente se describen 4 formas clínico-patológicas de melanoma cutáneo en relación a la localización anatómica y a su evolución. Las tres formas clínicas: melanoma de extensión superficial, el léntigo melanoma maligno y el melanoma lentiginoso acral, tienen una fase de crecimiento intraepidérmica larga, en la cual el tumor está completamente limitado a la epidermis. El cuarto tipo de melanoma, el melanoma nodular, tiene una fase de crecimiento intraepidérmica muy corta con el paso al crecimiento vertical (dérmico) rápido. En la actualidad se considera el melanoma como una sola entidad que puede evolucionar hacia una forma clínico-patológica u otra dependiendo de varios factores no bien establecidos como la localización anatómica, y/o el daño solar asociado ⁶⁹.

1. **Melanoma de Extensión Superficial:** El melanoma de extensión superficial es la forma más frecuente de melanoma ya que representa el 70% de los casos de melanoma. Puede localizarse en cualquier zona del cuerpo, siendo más frecuente en el torso de los varones y en las extremidades inferiores de las mujeres. La edad media en el momento del diagnóstico es de 44 años, y generalmente la lesión tiene una evolución de entre 1 y 5 años. La lesión clínica suele ser una placa pigmentada, palpable, de 1 a 2.5 cm de diámetro, de color marrón oscura, negra o pardusca, que puede presentar áreas claras que reflejan regresión tumoral.¹⁴

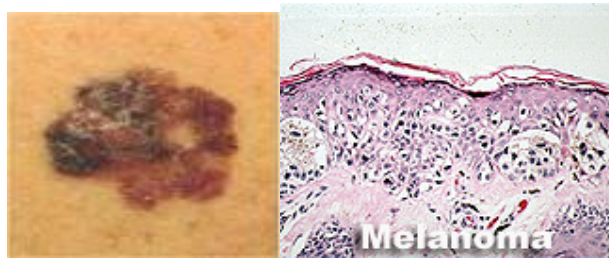


Figura 1.7

2. **Melanoma Nodular:** El melanoma nodular es la segunda forma de melanoma en frecuencia, representando un 10-15% de los casos de melanoma. Puede desarrollarse en cualquier localización, siendo discretamente más frecuente en torso de los varones y en las piernas de las mujeres. El melanoma nodular tiene una fase de crecimiento corto, entre 6 y 18 meses. Clínicamente la lesión suele tener entre 1 y 2 cm de diámetro y aparece como una lesión papulo-nodular, pigmentada, de coloración marrón oscura, negra con áreas sonrosadas.¹⁴(Figura 1.7)

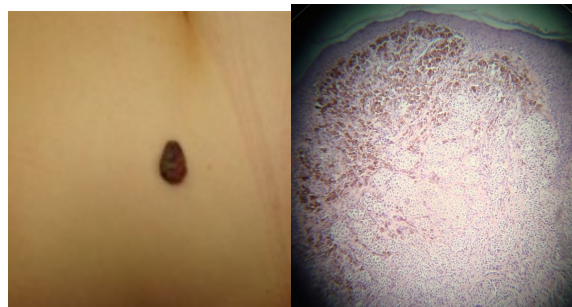


Figura 1.8

3. **Lentigo Melanoma Maligno:** El lentigo melanoma consiste en una lesión pigmentada que se observa en áreas expuestas (con daño solar intenso), especialmente en cara y el cuello de personas mayores. Esta lesión fue descrita en 1890 por Hutchinson y posteriormente por Dubreuilh. En la actualidad se habla de lentigo

maligno cuando la lesión está limitada a la epidermis en la unión dermoepidérmica y de lentigo melanoma maligno cuando la lesión se hace invasiva. La incidencia anual de lentigo maligno se sitúa entre 1 y 1.5 por cada 100.000 habitantes, con un porcentaje en aumento, que lo sitúa entre el 4 y el 15% de los casos de melanoma.¹⁴ (Fig. 1.8)

4. Melanoma Lentiginoso Acral:

El melanoma lentiginoso acral es el menos frecuente, representando un 2-8% de los melanomas, pero es la forma más frecuente de melanoma en personas de raza negra y asiáticos. Esta forma de melanoma se localiza especialmente en palmas, plantas, y región periungueal. Generalmente se observa en personas mayores, con una edad media de 65 años, y un período de evolución de 2.5 años.^{14,72}(Fig. 1.9)



Figura 1.9

5. Formas menos frecuentes de melanoma

a) Melanoma de mucosas:

Los melanomas en mucosas pueden localizarse a nivel de la mucosa genital, oral o conjuntival. Suelen tener una fase de crecimiento radial o pagetoide semejante a la del melanoma de crecimiento superficial. (Fig. 1.10)



Figura 1.10

b) **Melanoma desmoplásico** Es una variante clínico-patológica poco frecuente, que se presenta clínicamente como una lesión banal, que posteriormente desarrolla un tumor profundo, fibroso, con predominio de células fusiformes, caracterizado por una tendencia a las recidivas locales múltiples y con gran capacidad de infiltración local

mientras que el riesgo desarrollo de metástasis es similar o más bajo que las formas de melanoma.^{4,14}

1.4.4 Diagnóstico Clínico de Sospecha de Melanoma:

El diagnóstico clínico de melanoma se basa en el reconocimiento de las características clínicas de las formas de melanoma, es decir la observación de una lesión inicialmente macular pigmentada, de crecimiento asimétrico, de bordes imprecisos y coloración abigarrada con áreas negras y áreas menos pigmentadas y azuladas que representan áreas de regresión. La utilización sistemática de los criterios clínicos resumidos en el acrónimo ABCDE^{67,45}.

El Alfabeto del Melanoma

Las primeras cinco letras del alfabeto son una guía para los signos precoces de advertencia del melanoma.

A.....ASIMETRÍA

B.....BORDE

C.....COLOR

D.....DIÁMETRO

E.....EVOLUCIÓN o cambio⁶⁷

1.4.5 PATOGENIA DEL MELANOMA

El Melanoma es el tumor maligno con mayor tasa de crecimiento en el mundo. En su patogenia participan tanto factores ambientales como factores predisponentes del huésped. Según González, V., dentro de los factores ambientales participan los Rayos Ultravioleta, principalmente de forma intermitente y en etapas tempranas de la vida. De los factores relacionados con el huésped, se conocen en la actualidad múltiples mutaciones genéticas, transmisibles (enfermedad poligenica) que confieren a su portador mayor riesgo de desarrollar melanoma debido, entre otros factores a la resistencia a la apoptosis.³⁰

1.4.5.1 Factores Ambientales

Aunque los melanomas se originan también de lesiones preexistentes (Nevus) o de Novo. La mayor parte de los melanomas se relacionan a la exposición solar crónica o intermitente. La causa de los melanomas acrales y mucosos es desconocida^{44,23}.

Radiación ultravioleta. El sol es el principal factor de riesgo ambiental para melanoma, factible de modificar. Existe una asociación positiva importante de la exposición solar intermitente (odds ratio, OR=1,87), la quemadura solar en la adolescencia (OR=1,95) y las quemaduras solares en la niñez (OR=1,62). La localización anatómica más frecuente de los melanomas de extensión superficial es el tronco en los varones y las extremidades inferiores en las mujeres, que pueden explicarse por la exposición solar intermitente y reflejan las diferencias en la vestimenta según el sexo.^{2,28,60.} Algunos factores individuales, como el color de la piel, del pelo o de los ojos, elevan la susceptibilidad a los rayos ultravioleta y asimismo, el riesgo de desarrollar melanoma; esto se ha demostrado en múltiples estudios epidemiológicos desde los años ochenta^{2,71,28,60.}

La exposición solar crónica, definida como una exposición ocupacional, ha sido blanco de múltiples estudios. La suma de OR(odds ratios) muestra esencialmente que esta exposición no incrementa el riesgo de melanoma de extensión superficial (RR=0,95) (IC95% 0,87-1,04)^{28,60} Sin embargo, la exposición solar crónica sí se relaciona con la aparición de lentigo maligno². Otros autores como Rapini R. mencionan que el melanoma es mas frecuente en zonas cubiertas del sol, especialmente en brazos y piernas, observándose más frecuentemente el Carcinoma Basocelular y el Carcinoma Epidermoide con la exposición crónica al sol. Solamente 1/3 de los melanomas se relacionan con lesiones nevicas preexistentes y 2/3 se relacionan con lesiones de novo⁶³.

Protectores solares. La protección física contra la exposición solar se acepta como un factor importante en la reducción del riesgo de melanoma. El uso de ropa oscura, sombreros, el evitar la exposición en horas de sol intenso, entre otros, son mecanismos útiles de protección solar. Estas medidas son especialmente importantes en niños y adolescentes.³⁵ Basados en la premisa de que muchos protectores solares no son efectivos igualmente para los rayos UV-B que para los UV-A, se había pensado que el uso de estas fórmulas aumentaba el riesgo de melanoma al brindar una falsa seguridad de protección contra la exposición solar. En un metanálisis de 18 estudios se concluyó que el uso de protectores solares no se asocia con un incremento del riesgo de melanoma⁷⁰. La afirmación de que la radiación UV-A es la causa del melanoma, es controvertida; sólo ha sido posible su verificación en modelos animales con el uso de

especies de peces *Xiphophorus*, en los cuales esta radiación es inductora de melanoma.^{85,42}

1.4.5.2 Tipos de piel

El color de la piel de cada persona depende del número, tamaño y densidad en melanina de los melanosomas de la piel. El bronceado se produce por el estímulo de los rayos ultravioletas en la formación de melanina y su duración depende de la dosis total de radiación recibida, del patrón de exposición a la radiación y de las características particulares de cada individuo (Tabla 1.1). Ante una irradiación excesiva pueden generarse melanocitos en los que se haya mutado su ADN.³⁴

Fototipo de piel	Descripción del fenotipo
I	Blanco, siempre se quema, nunca se broncea
II	Blanco siempre se quema, a veces se broncea
III	Blanco a veces se quema, siempre se broncea
IV	Blanco raras veces se quema, siempre se broncea
V	Moreno, moderadamente pigmentado

Tabla 1.1

1.4.5.3 Genes involucrados en el Melanoma

La oncogénesis es un proceso complejo que se debe a alteraciones genéticas adquiridas o heredadas y conduce a una regulación aberrante del ciclo celular, produciéndose un desbalance entre los genes supresores tumorales y los oncogenes. Los genes supresores tumorales inhiben la proliferación o promueven la muerte celular por medio de apoptosis y son los más afectados. Los oncogenes estimulan la progresión tumoral. Este grupo incluye protooncogenes que codifican proteínas que regulan el ciclo celular. Ciertas mutaciones o variantes alélicas (polimorfismos) dan mayor susceptibilidad al melanoma. Se conocen alrededor de 600 genes relacionados directa o indirectamente con el melanoma que llevan al desarrollo tumoral.^{78,7.}

1.4.5.3.1 Genes de Susceptibilidad al Melanoma

Se describen actualmente dos grandes grupos:

Genes de alta Prevalencia y baja penetrancia: Afectan a un gran número de personas pero la penetración es baja, se encuentran en pacientes con melanomas esporádicos y confieren riesgo bajo o moderado de padecer la enfermedad. El prototipo es el gen del receptor de la melanocortina 1 o MC1R.

Genes de baja prevalencia y alta penetrancia

Afectan a pocos individuos pero con alta penetrancia confiriendo alto riesgo de melanoma. Se encuentra en familias con varios miembros afectados con fuerte predisposición al melanoma. Entre ellos se encuentra el Gen **CDKN2A** (ciclina dependientes del inhibidor de cinasas 2A) que es el mayor gen de susceptibilidad al melanoma y el **CDK4**^{30,55,26}.

1.4.5.3.2 Genes de Alto Riesgo

Gen CDKN2A

Es un gen supresor situado en el cromosoma 9p21. Es el de mayor riesgo conocido hasta ahora y el mejor estudiado. Las alteraciones de este gen se hallan principalmente en casos de melanoma familiar y es la causa más común de susceptibilidad hereditaria al melanoma. También es un gen de alto riesgo para cáncer de páncreas. Se heredan de forma autosómica dominante con penetración variable. CDKN2A tiene 3 exones: 1, 2, 3. La mayoría de las mutaciones ocurre en el exón 2 que codifica 2 proteínas supresoras tumorales p16 o INK4A (inhibidor de CDK4) codificada en los exones 1 alfa, 2, 3 y p14 o ARF (*alternate reading frame*). Ambas proteínas inhiben el ciclo celular y regulan la diferenciación. La p14 también regula la apoptosis ya que actúa a través de la vía p53 y de la proteína del retinoblastoma (Rb)^{86,32,55,26,9,66,76,77}.

Al disminuir los niveles de p53 se reduce la muerte celular programada.⁵⁵ La p16 inhibe al complejo CDK4 que induce a la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb). Si la función de p16 está disminuida, Rb se fosforila y libera al factor de transcripción E2F la cual induce al paso G1 a S, se activa el ciclo celular. E2F está sobre expresado en melanomas avanzados³. La mutación de p16 se ve en el 60 % de los casos, se asocia a peor pronóstico en el melanoma familiar y cáncer de páncreas⁷⁴.

Gen CDK4/CCND1

Es un gen codificado en 12p14 la cual es menos frecuente que CDKN2A, pero se ha descrito en algunos grupos familiares. Este gen actúa a través de la vía del Retinoblastoma. P16 inhibe al CDK4 impidiendo el crecimiento de células con daño del ADN o con activación de oncogenes. El oncogén CCND1 (ciclina D1) es un componente del complejo CDK4 y recientemente se ha descrito su amplificación en el 45 % de los melanomas acrales. También se ha descrito en melanomas mucosos.^{18,26}

1.4.5.3.3. Genes de Riesgo Moderado

MRC1

Este gen, de alta prevalencia pero baja penetrancia, codifica el receptor transmembrana de la MSH alfa y ACTH, esta localizado en varios tipos de células y melanocitos. La unión de MSH a su receptor activa la síntesis de AMPc, la cual estimula la producción de eumelanina, la proliferación del melanocito y efectos antiinflamatorios, antioxidantes.^{24,26}

Es un gen altamente polimorfo del que existen más de 100 variantes alélicas, presentes en el 70 % de la población. La mayoría han sido descritos en personas de piel clara con efélides y pelo rojo (variante “R”) pero también aumenta la susceptibilidad en personas de piel oscura. Las mutaciones del MCR1 confieren riesgo de mutación del BRAF en algunos pacientes⁷⁸ Este gen se encuentra en el extremo telomérico del cromosoma 16q24.5 y codifica un receptor transmembrana acoplado a la proteína G expresado por muchos tipos celulares, incluidos los melanocitos de la piel. El MC1R es el receptor de péptidos sintetizados en la glándula pituitaria, derivados de la proopiomelanocortina como la MSH-alfa y ACTH. Ambos se unen con la misma afinidad a MC1R activando una adenilciclase que incrementa la producción intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Éste favorece la transcripción y traducción de tirosinasa, y de esta manera, la síntesis fotoprotectora de eumelanina y la proliferación melanocítica^{75, 1.}

Numerosos polimorfismos del gen MC1R se han aislado en la población mundial, sobre todo en raza caucásica^{11,79}. Ante tal diversidad, se estableció por consenso entre los resultados de varios grupos de trabajo cuál era la variedad o alelo más frecuente o común (wild type), que recientemente se ha secuenciado completamente y está presente en principio en la población asiática y africana^{11,73}. Aproximadamente 30 variantes alélicas han sido descritas hasta ahora, nueve de las cuales han demostrado ser variantes

con pérdida de función ⁷⁵. Algunas de estas variantes (Val60Leu, Ile40Thr, Arg142His, Arg151Cys, Arg162Pro, Arg160Trp, Asp294His) son incapaces de sintetizar AMPc con la misma eficacia de la variante común o wild type de MC1R en respuesta a la estimulación de MSH- α ⁸, mientras que otras variantes (Val122Met) demostraron una menor afinidad de unión con la MSH- α ³⁹. Estos sujetos tendrían una expresión supresora en la función fisiológica del MC1R, es decir, los melanocitos sintetizarían feomelanina en lugar de eumelanina.

Tres variantes alélicas de MC1R (Arg151Cys, Arg160-Trp, Asp294His) se asocian claramente con la presencia de pelo rojo, piel clara, ausencia de capacidad para broncearse correctamente y una gran predisposición para desarrollar lentigos solares. Además, otros 7 alelos (Val60Leu, 86insA, Asp84Glu, Arg142His, Ile155-Thr, 537insC, His260Pro) pueden considerarse alelos asociados a este fenotipo de forma parcial o total ⁸. El conjunto de estas características, denominado fenotipo RHC (red hair color), constituye un factor de riesgo tanto para el melanoma como para el cáncer cutáneo no melanocítico, especialmente cuando se combina con factores de riesgo ambientales como la exposición de altas dosis de radiación UV.

Además, algunos trabajos señalan que algunos de estos polimorfismos de MC1R otorgarían una mayor susceptibilidad para el desarrollo de melanoma esporádico y cáncer cutáneo no melanoma de forma independiente a la presencia del fenotipo RHC ^{11,79,59,43,5,23}. Recientemente, Matichard et al ⁵¹ han estudiado el papel de las variantes de MC1R en la población francesa. Tras estudiar 108 pacientes con melanoma, incluyendo casos de melanoma familiar y esporádico, pero sin mutaciones en p16, y 105 controles, observaron una diferencia significativa ($p < 0,0001$) en cuanto a la presencia de variantes de MC1R hipofuncionantes entre casos (68 %) y controles (31 %). Las variantes con asociación significativa fueron Val60Leu, Arg151Cys y Arg160Trp. Este riesgo persistía tras estratificar los resultados según el fenotipo cutáneo, el color de pelo, la presencia de lentigos solares y los parámetros de exposición UV.

Box et al ¹¹ estudiaron el efecto derivado de la presencia de polimorfismos del gen MC1R en familias australianas portadoras de diferentes mutaciones en el gen CDKN2A ¹³. La presencia de una variante alélica del MC1R aumentaba el riesgo de desarrollar un melanoma tanto en portadores de mutaciones de CDKN2A como en no portadores. El impacto sobre el riesgo de melanoma en los portadores de un alelo de MC1R y una mutación en CDKN2A, comparado con los portadores de una única mutación del CDKN2A, se reflejaba al aumentar la penetrancia para desarrollar un

melanoma del 50 al 83 %, y un descenso en la edad media de diagnóstico del melanoma de 58,1 a 37,8 años.⁶⁰ Se han descrito mutaciones del gen p16/CDNK2A asociadas tanto a casos de melanoma esporádico múltiple sin historia familiar⁵² como en familias con múltiples casos de melanoma³⁵. En general, las mutaciones puntuales predominan en el melanoma familiar, mientras que las deleciones constituyen el mecanismo de inactivación más importante en el melanoma esporádico, así como hallarse con mayor frecuencia en los cultivos de células tumorales. Estudios en melanoma metastático con frecuencia no presentan alteraciones en el gen de p16, por lo que estas mutaciones no parecen tener un papel relevante en la capacidad de metastatizar del melanoma⁴⁸ por lo que sería una insuficiente cantidad de p16 y, por tanto, una mala regulación del ciclo celular, la que empujaría a los melanocitos hacia una progresión tumoral^{31, 28, 33}.

A pesar de estos hallazgos, existen todavía muchas cuestiones por resolver en cuanto al papel del MC1R en la susceptibilidad al melanoma. En primer lugar, los estudios realizados hasta ahora se han llevado a cabo en población caucásica, generalmente del norte de Europa con fenotipo RHC, por lo que desconocemos la relación de las variedades de MC1R y melanoma en el resto de la población mundial. Por otro lado, para la mayoría de la comunidad científica no está claro que el riesgo de melanoma atribuible a las variantes de MC1R sea independiente de sus efectos sobre la pigmentación. Tampoco se ha estudiado el papel de MC1R en el melanoma familiar, salvo en familias australianas⁵⁹. Y finalmente, se desconoce el papel de MC1R en la interacción que tendría con la radiación UV.⁵⁹

Se han intentado aislar otros genes de baja penetrancia y alta prevalencia para el melanoma. El gen XRCC3 codifica una proteína involucrada en la reparación de la doble cadena de ADN, así como en la reparación de fragmentación, translocación y deleción cromosómica Winsey et al⁸² encontraron la presencia de un alelo T en el exón 7 del gen XRCC3 que se asociaba significativamente con el desarrollo en una población de melanoma con alto riesgo de metástasis respecto a grupo control. Sin embargo, otros trabajos no han podido confirmar esta asociación^{22,7}.

1.4.5.3.4 Otros Genes Involucrados:

Existen distintas vías de formación de melanomas que dependen de factores genéticos y ambientales. Los melanomas del tronco y las extremidades se relacionan a través de

estudios epidemiológicos con las exposiciones discontinuas al sol y presentan habitualmente mutaciones en BRAF o NRAS¹⁴.

BRAF es un oncogén que, localizado en 7q34, está implicado en la vía de señalización Ras/RAF/MAPK que regula la respuesta celular a partir de las señales emitidas por los receptores de factores de crecimiento. Hasta un 10% de los melanomas primarios y metastáticos presentan mutaciones en N-RAS. Las mutaciones en BRAF y NRAS son excluyentes, ya que ambas se encuentran en la misma vía.

Los melanomas de aparición en zonas de exposición continua al sol rara vez presentan mutaciones en BRAF o NRAS y muestran activación de la ciclina D1. La disección del genoma del melanoma revela un número variable de mutaciones. Una importante vía es la de RAS /actividad mitótica de proteincinasa (MAPK), la cual regula la proliferación celular y sobrevivencia de varios tipos celulares. Las mutaciones celulares activas en NRAS y BRAF tienen una combinación de aproximadamente el 90% en melanomas y lesiones melanocíticas benignas, que sugieren la activación de la vía MAPK como un componente esencial temprano en la proliferación melanocítica. Vanbrocklin M. et al. Estudiaron la activación de la proteincinasa activada mitogena la cual está implicada en la progresión y desarrollo de muchos cánceres humanos.¹⁴ Específicamente la mutación activada de NRAS y BRAF que ha sido identificada en un 85 % de melanomas y los componentes de esta vía han sido desarrollados como dianas moleculares, la inhibición de la molécula pequeña específica MEK que induce a un amplio rango de respuesta apoptótica en células del melanoma tanto in vivo como in vitro. Se han hecho estudios moleculares que comprueban la inhibición de la actividad mitogena de la proteincinasa que induce a translocaciones de Bmf promoviendo la apoptosis en el melanoma. Para definir el mecanismo molecular y la variable sensibilidad apoptótica de las células del melanoma a la inhibición de MEK se ha estudiado la expresión y localización subcelular de Bcl-2 en miembros familiares en un set comprensivo de las células del melanoma humano. Mientras que la proteína apoptótica Bim fue activada y localizada en la membrana mitocondrial en todas las líneas celulares de sensibilidad apoptótica activación de Bmf y translocación citosólica fue exclusivo de células sensibles. Se ha demostrado el rol primordial de Bmf en la promoción de la apoptosis y su rol en los

Mecanismos de resistencia apoptótica de MEK¹⁴. **(Fig. 1.11)**

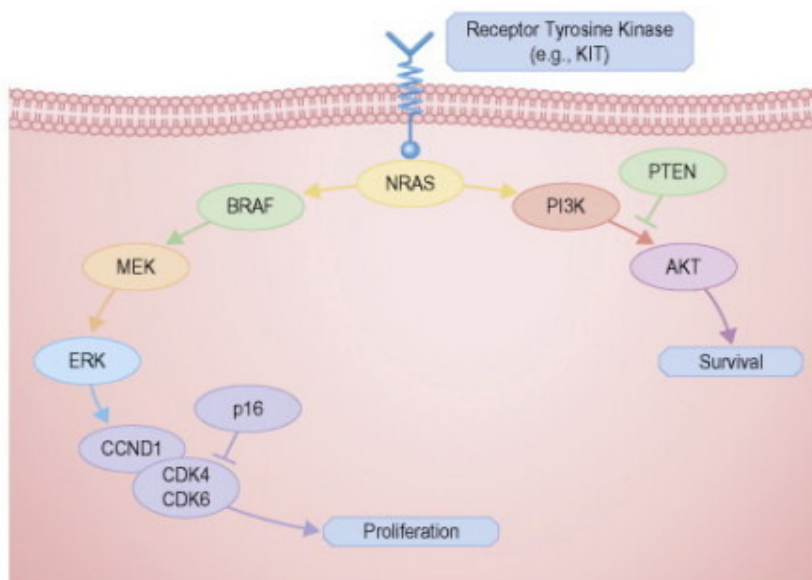


Figura 1.11

Mecanismos de Resistencia apoptotica MEK

1.4.6 Clasificación Molecular del Melanoma

Varias de las moléculas pertenecientes a este grupo son factores de crecimiento, receptores de los mismos o proteínas involucradas en las vías de señalización intracelular, con efecto proliferativo o antiapoptótico, la mayoría producto de oncogenes²⁷. Las células de melanoma tienen fuertemente activadas estas vías, ya sea a través de mutaciones de genes que codifican proteínas implicadas en las mismas, como a variaciones en los niveles de expresión proteica. Por ello, poseen gran capacidad proliferativa y una resistencia natural a los mecanismos extrínsecos y/o intrínsecos que inducen la muerte celular programada o apoptosis. Algunos de los mecanismos responsables de la alteración de dichas redes de señalización celular son los siguientes:

- 1) la activación constitutiva de receptores de factores de crecimiento (c-Kit, PDGFR- α , EGFR);
- 2) la activación de la vía de señalización de las MAP-quinasas (RAS/RAF/MEK/ERK);
- 3) la activación constitutiva de la vía AKT (PI3K/AKT), favorecida entre otros mecanismos por mutaciones, deleciones o silenciamientos del gen supresor tumoral PTEN;
- 4) las alteraciones de la red de control del ciclo celular (deleción, silenciamiento o mutación de CDKN2A, amplificación de CDK4 o de CCND1);
- 5) el deterioro de la actividad transcripcional de la proteína proapoptótica p53, y
- 6) la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, resultado de las aberraciones en varias de las vías de señalización intracelular mencionadas^{69, 53, 25}.

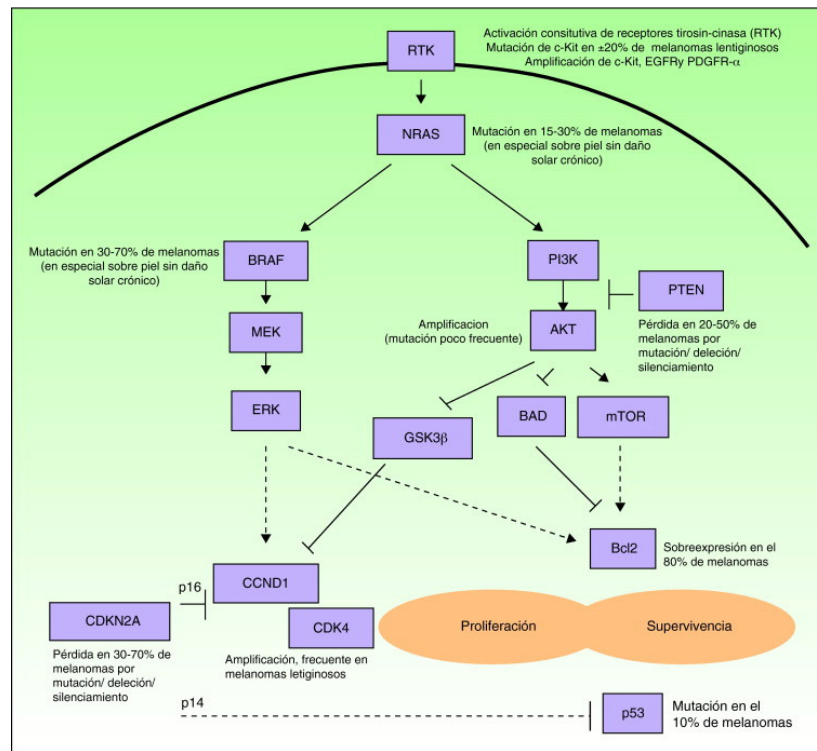


Figura 1.12. Esquema simplificado de Estimulación del ciclo celular

Algunas de las principales vías intracelulares implicadas en favorecer la proliferación (estimulación del ciclo celular) y la supervivencia (estimulación de los mecanismos antiapoptóticos y supresión de los mecanismos proapoptóticos) de las células de melanoma. Muchos melanomas poseen una activación constitutiva de receptores de factores de crecimiento con actividad tirosin-quinasa (RTK) (pe, c-Kit, PDGFR- α y/o EGFR), ya sea por amplificaciones o mutaciones de los genes que los codifican. Asimismo, presentan activación de la vía de señalización de las MAP-quinasas (proteín cinasas activadas por mitógenos) (RAS/RAF/MEK/ERK), debida fundamentalmente a mutaciones de NRAS Curtis et al., encontraron en un estudio realizado en la Universidad de California, San Francisco, de especímenes provenientes de 7 centros de referencia, en muestras de diferentes tipos de melanomas denominado "Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma". El estudio muestra distintas alteraciones genéticas en los cuatro grupos de melanomas primarios. Los Melanomas sin daño solar crónico tienen frecuentes mutaciones de BRAF y pérdida del cromosoma 10, mientras que los melanomas con daño solar crónico es infrecuente la mutación de BRAF y frecuentemente se incrementa el número de copias del gen CCND1.¹⁹

Distribución de frecuencia de alteraciones genéticas en BRAF, NRAS, Y KIT entre cuatro grupos de melanoma: Non-CSD, (melanomas sobre piel sin daño crónico

inducido por sol); CSD, (melanomas sobre piel con daño crónico inducido por sol como evidenciado por la presencia de elastosis marcado solar); melanomas lentiginosos acrales sobre las plantas, palmas, o sub-ungual, melanomas mucosos. Un melanoma CSD presento mutación KIT y NRAS, y un melanoma lentiginoso acral presento la mutación KIT y BRAF¹⁹. Una mutación de c-KIT, o un número de copias mayor, se relacionan con melanomas de la mucosa o acrales (que comprenden 6 a 7% de los melanomas en la población caucásica pero que constituyen el subtipo más común en la población asiática⁵⁰ (Figura 1.13.)

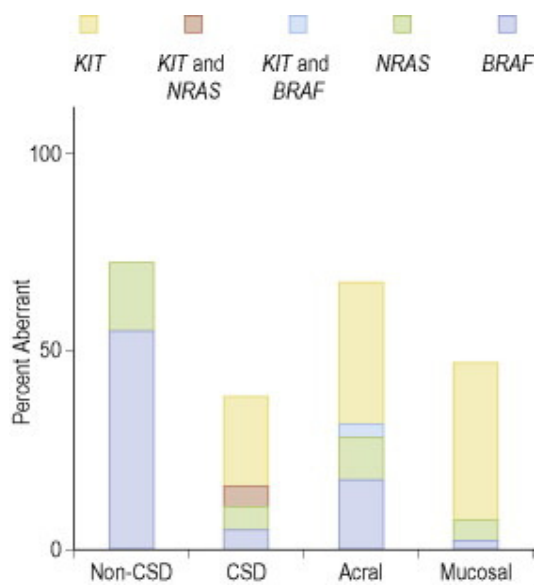


Figura 1.13

Frecuencia de Alteraciones Genéticas en BRAF;NRAS Y KIT⁷⁶.

Las lesiones moleculares de estos dos tipos son probablemente necesarias pero no suficientes para la aparición del melanoma. Los nevos melanocíticos tienen las mismas alteraciones de NRAS y BRAF presentes en los melanomas y se malignizan con muy poca frecuencia, probablemente porque la señal RAS sin restricción conduce a la senescencia celular. p16/INK4a parece esencial para la senescencia celular inducida por oncogenes y en su ausencia la proliferación persiste, poniendo a los melanocitos en riesgo de una transformación a melanoma.⁶⁰

La mutación de BRAF puede presentarse de un 30 a 70 % de los melanomas principalmente en aquellos sin daño solar crónico. El 90 % de los casos la mutación de BRAF es siempre la misma, una mutación puntual en el exon 15 (cambio de timina por adenina) que cambia la posición del ácido glutámico por valina en la posición 600 de la proteína BRAF (mutación V600E)⁵⁰. Un concepto importante que ha cambiado la

estrategia con la que abordar el tratamiento del melanoma metastásico ha sido el comprobar que el melanoma es un tumor genéticamente heterogéneo, de modo que las alteraciones anteriormente mencionadas varían de unos subgrupos de melanoma a otros. Aunque datos anteriores ya apuntaban en esta dirección, los primeros trabajos extraordinariamente relevantes en este sentido fueron los publicados en 2005 y 2006 por Curtin et al.¹⁹. Dichos autores dividieron a los melanomas cutáneos y mucosos en los siguientes 4 grupos relacionados con distintos patrones de exposición solar y diferente localización anatómica: 1) melanomas sobre piel sin daño solar crónico (o melanoma relacionado con la exposición solar intermitente); 2) melanomas sobre piel con daño solar crónico (que corresponderían fundamentalmente al melanoma sobre lentigo maligno); 3) melanomas acrales, y 4) melanomas de mucosas. Hallaron que, mientras el 81% de los melanomas en piel sin daño solar crónico tenía mutaciones de BRAF o de NRAS (que eran mutuamente excluyentes), la mayoría de los melanomas de los otros tres grupos, los tres con un patrón histológico lentiginoso, no presentaban mutaciones de estos genes, pero sí amplificaciones de los genes CDK4 y CCND1 (ciclina D1) y/o aberraciones genéticas de c-Kit que incluían mutaciones y amplificaciones.^{19,18.}

Gen p53

La mutación en el gen supresor de tumores p53, se asocia con muchos tipos de cáncer en humanos y está favorecida por la radiación ultravioleta (UV). Whiteman et al., en un estudio de casos y controles, investigaron los factores genéticos y ambientales asociados con melanomas positivos y negativos para la mutación de p53, en hombres mayores de 50 años.² Los resultados de este estudio demuestran que existen dos grupos de pacientes:

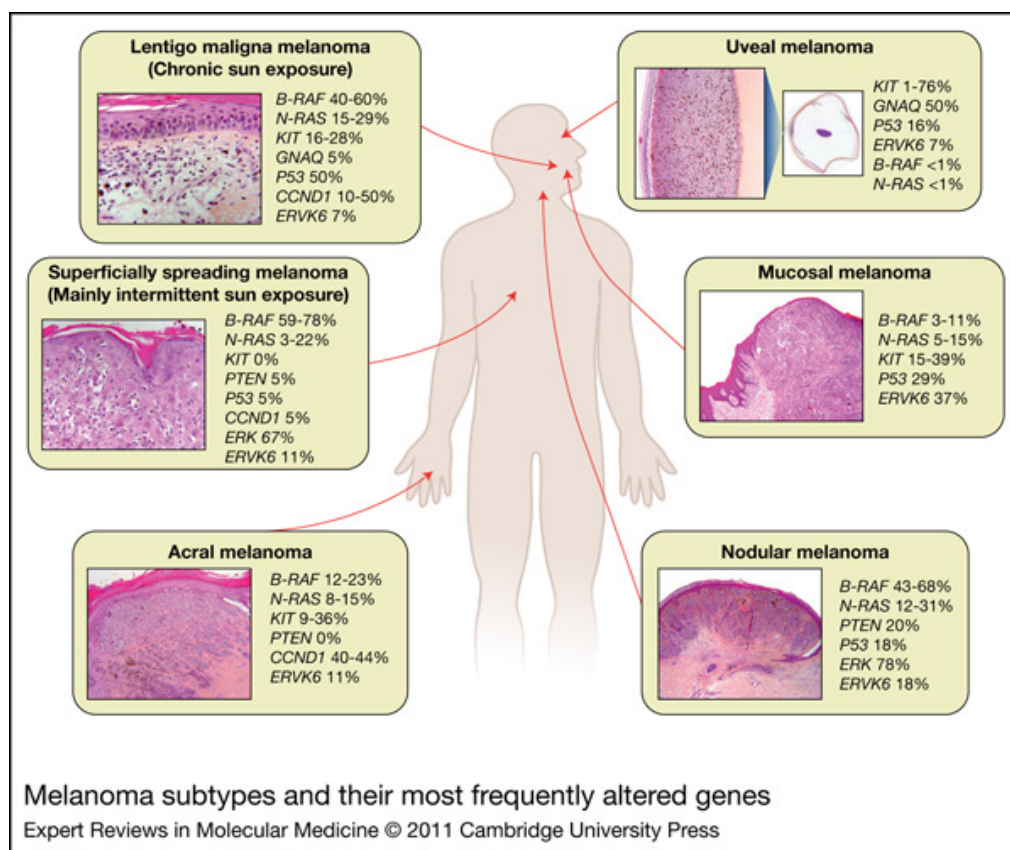
Riesgo de melanoma positivo para la mutación de p53:

1. Pacientes con aumento de la sensibilidad al sol, demostrado por la aparición de quemaduras y ampollas con la exposición solar, ausencia de nevus o presencia de uno solo².

Riesgo de melanoma negativo para la mutación de p53:

2. Pacientes con 25 o más nevus en las extremidades superiores, la espalda y los hombros, presencia de efélides en la infancia, sin historia de aumento de la sensibilidad al sol.

Los autores sugieren que, en las personas con baja susceptibilidad para desarrollar nevus, la transformación de melanocitos epidérmicos requiere de la exposición solar crónica (mutación de p53 y, en las personas con muchos nevus debe existir un factor intrínseco que favorece la proliferación de melanocitos, sin relación con la expresión exagerada de p53 ² (Fig. 1.13)



Subtipos de Melanomas y sus más frecuentes alteraciones genéticas²

Figura 1.14

1.4.7 PRONOSTICO

The American Joint Cancer Commission, utiliza un sistema de estatificación de los enfermos con melanoma basado en el estudio del TNM que aparece en la tabla siguiente, que mediante la utilización de datos clínicos y histológicos en relación a las características del tumor (espesor y presencia o no de ulceración), presencia y número

de ganglios linfáticos afectos y las características de estos (micrometástasis o macrometástasis) y la presencia o no de metástasis a distancia, permite clasificar a los melanomas en los estadios clínicos dividiendo a los pacientes en los que tienen la enfermedad localizada (estadios I y II) con enfermedad ganglionar y regional (estadio III) y con metástasis a distancia (estadio IV) este sistema de estadificación permite clasificar a los pacientes en subgrupos homogéneos facilitando su inclusión en ensayos clínicos y la comparación de resultados así como facilita la información pronóstico. En la ultima reunión de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) el sistema de estadificación 2009, evalúa el espesor de Breslow, presencia de ulceración, micrometastasis nodal y macrometastasis para pronóstico de supervivencia de 1,5 y 10 años.¹⁸ (Tabla 1.2)

Tabla 1.2 AJCC 2009 (7th Edition)
Revised Melanoma Staging System (effective, January 2010)

Stage	Histological features/TNM classification	Overall survival		
		1 year (%)	5 years (%)	10 years (%)
0	Intraepithelial/in situ melanoma (TisN0M0)		100	100
IA	<u>≤1mm without ulceration and mitoses <1/mm²* (T1aN0M0)</u>		97	93
IB	≤1mm with ulceration or level IV/V (T1bN0M0)		94	87
	1.01–2mm without ulceration (T2aN0M0)		91	83
IIA	1.01–2mm with ulceration (T2bN0M0)		82	67
	2.01–4mm without ulceration (T3aN0M0)		79	66
IIB	2.01–4mm with ulceration (T3bN0M0)		68	55
	>4mm without ulceration (T4aN0M0)		71	57
IIC	>4mm with ulceration (T4bN0M0)		53	39
IIIA	<u>Single regional nodal micrometastasis**, nonulcerated primary (T1–4aN1aM0)</u>		78	68
	2–3 microscopic regional nodes, nonulcerated primary (T1–4aN2aM0)			
IIIB	Single regional nodal micrometastasis, ulcerated primary (T1–4bN1aM0)		59	43
	2–3 microscopic regional nodes, ulcerated primary (T1–4bN2aM0)			
	<u>Single regional nodal macrometastasis***, nonulcerated primary (T1–4aN1bM0)</u>			
	2–3 macroscopic regional nodes, nonulcerated primary (T1–4aN2bM0)			
	In-transit metastasis(es)/satellite lesion(s) without metastatic lymph nodes (T1–4a/bN2cM0)			
IIIC	Single microscopic regional node, ulcerated primary (T1–4bN1bM0)		40	24

	2–3 macroscopic regional nodes, ulcerated primary (T1–4bN2bM0)			
	In-transit metastasis(es)/satellite lesion(s) without metastatic lymph nodes, ulcerated primary(T1–4bN2cM0)			
	4 or more metastatic nodes, matted nodes/gross extracapsular extension, or in-transit metastasis(es)/satellite(s) and metastatic nodes (anyTN3M0)			
IV	Distant skin, subcutaneous, or nodal metastasis with normal LDH (any T any NM1a)	62		
	Lung metastasis with normal LDH (any T any NM1b)	53		
	All other visceral metastasis with normal LDH or any distant metastasis with increased LDH(any T any NM1c)	33		

(Adapted with permission from AJCC Cancer Staging Manual, 7th Edition (2009) Eds: Edge SB, et al. Melanoma of the Skin, pp.325–344. Springer-Verlag, New York.© and Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J. et al. (2009) Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. J Clin Oncol, 27; 6199–6206)¹⁴

1.4.7.1 Factores histológicos

Actualmente el factor pronóstico histológico más importante en el melanoma localizado es el espesor de Breslow, siendo la ulceración el segundo factor pronóstico en importancia.

El espesor tumoral o índice de Breslow se relaciona con la supervivencia siguiendo una curva exponencial; con fines prácticos, se consideran cuatro segmentos definidos entre los valores ≤ 1.0 , 1.01-2, 2.01-4 y > 4 mm.³⁴

Se considera la presencia de ulceración tumoral cuando la epidermis que recubre el melanoma ha desaparecido y es reemplazada por un exudado inflamatorio. La ulceración es un factor pronóstico independiente que añade información al índice de Breslow.³⁴

El nivel de invasión de Clark ha perdido relevancia como factor pronóstico, al ser una medida subjetiva y dependiente de la localización del melanoma, considerándose sólo en lesiones menores o iguales a 1 mm.

Los niveles de invasión o niveles de Clark, describen la invasión de la tumoración en los diferentes niveles cutáneos. El nivel I describe los tumores puramente epidérmicos; el nivel II indica que la tumoración atraviesa la unión dermoepidérmica con invasión de la dermis papilar; el nivel III describe las tumoraciones que ocupan toda la dermis papilar expandiéndola; el nivel IV indica que la tumoración infiltra la dermis reticular y

el nivel V indica la invasión del tejido graso subcutáneo. El pronóstico empeora al aumentar el nivel, pero tiene menos valor que el espesor medido por medio del índice de Breslow y menos valor que el índice mitótico reflejado por el número de mitosis por milímetro cuadrado⁸³.

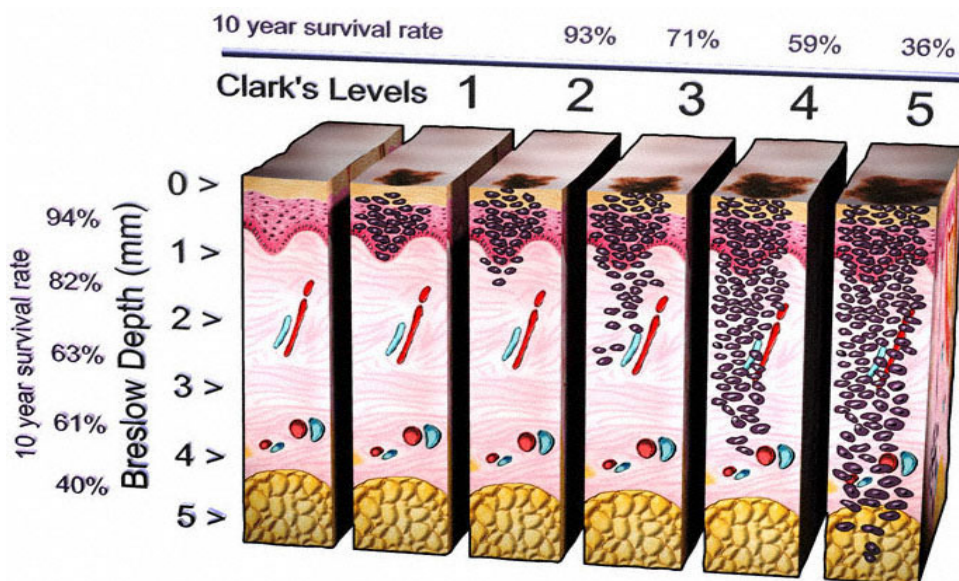


Figura 1.15

2001 Image by Med-Art ~ <http://www.med-ars.it>

1.4.7.2 Marcadores de Diferenciación Melanocítica

La mayor parte de los melanomas no requieren de técnicas de Inmunohistoquímica para su diagnóstico definitivo. Sin embargo en casos de variantes raras (melanomas amelanóticos, de células fusiformes, carcinomas indiferenciados) o metástasis, las técnicas de Inmunohistoquímica confirman el diagnóstico y facilitan la estadificación¹⁰. El marcador ideal para dicha diferenciación debe tener alta sensibilidad y especificidad sin embargo dicho marcador no existe aun. Debido a los problemas de la especificidad y la sensibilidad, es prudente usar dos o aún tres marcadores de melanoma en casos problemáticos. Los marcadores mas utilizados son:

S-100 es variablemente positivo en el 94-100 % de melanomas primarios y metastásicos. Además de melanocitos, células de Schwann, células mioepiteliales adipositos, condrocitos, células de Langerhans^{10,56}. Otro marcador es el HMB-45 que reacciona por presencia de la glicoproteína gp100 y es menos sensible que la proteína S-100⁵⁶, es expresado en el 80-86 % de melanomas metastásicos y entre el 90 % y el 100 % de tumores primarios. MART-1 o (Melan-A) es un antígeno de reconocimiento de diferenciación melanocítica por células T citotóxicas, tiene una sensibilidad similar

a la proteína S-100 en melanomas epitelioides, pero es menos sensible en tumores de célula fusiformes y por lo general no es expresado en la variante desmoplásicas.^{6,13,57}

Recientemente, un nuevo anticuerpo monoclonal, SM5-1, una variante de la fibronectina, su sensibilidad es similar a S-100 con la especificidad mejorada para la S 100 reactiva, pero el anticuerpo también reacciona con el carcinoma hepatocelular y células de cáncer de mama⁶⁵.

Ki-67 (MIB-1) es en particular valioso en la distinción entre nevos benignos melanocíticos (incluyendo nevos Spitz) y el melanoma⁸⁵. En nevos, menos del 5 % de núcleos es positivo (y estos por lo general son localizados en el aspecto más superficial del componente dérmico) mientras que en el melanoma revelan el 25 % o más de células⁶².

El ciclo celular de la célula está regulado por la activación e inactivación secuencial de una serie de moléculas que incluyen un grupo de subunidades reguladoras llamadas ciclinas y otro grupo de subunidades catalíticas denominadas quinasas dependientes de ciclina (CDK).

Las ciclinas son una familia de proteínas que, como indica su nombre, son sintetizadas y destruidas durante cada ciclo celular. Las CDK se unen a ciclinas específicas y son activadas por ellas, formando una serie de complejos en determinadas fases del ciclo celular que conducen a la célula de un estado del ciclo celular a otro. El gen p16 o CDKN2A o MTS1 es un gen supresor de tumores localizado en 9p21 (región 21 del brazo corto del cromosoma 9). Se encuentra situado en el locus génico INK4 y codifica para una proteína de 16 kDa. La proteína p16 bloquea la actividad del complejo CDK-ciclina D (bloqueándose la transcripción de importantes proteínas reguladoras del ciclo celular y provocando el reposo del mismo) e impide que el ciclo progrese de G1 a S, es decir, inhibe la proliferación de células en condiciones normales. La p16 o INK4

Inactiva CDK4, compitiendo con ciclina D1 para unirse a CDK4³³.

La pérdida de expresión de proteína p16 tiene correlación con el melanoma invasivo y metastático y por separado puede predecir un pronóstico pobre. P16 también puede ser provechoso en la diferenciación del nevo capsular del melanoma metastático en ganglios centinela^{64,33}.

El gen p53 también puede estar sobre expresado sobre todo en melanomas metastáticos en un 40 %, por lo tanto puede ser de valor en la distinción entre nevos (banal y Spitz) y el melanoma.⁶⁴

El gen *bcl2* codifica una proteína de 25 Kd localizada en las membranas mitocondriales, retículo endoplásmico y envoltura nuclear, la cual puede ser mostrada inmunohistoquímicamente en tejidos parafinados. La expresión citoplasmática excesiva de la oncoproteína *bcl-2* provoca la inhibición de la apoptosis, aumentando la probabilidad de generación de células cancerosas.

La familia *Bcl2*, aparte de en el linfoma folicular de células B, está implicada en un gran número de cánceres, incluyendo el melanoma y los carcinomas de mama, pulmón, próstata y pulmón. También se cree relacionado con la resistencia a los tratamientos antitumorales convencionales⁶⁴⁻³³.

1.4.8 TRATAMIENTO

El tratamiento actualmente sigue enfocado a la resección quirúrgica del tumor en una fase temprana y en la avanzada para poder lograr la estadificación del mismo en base a protocolos estandarizados de tratamiento. El tratamiento quirúrgico del Melanoma Lentigo Acral se basa en la lesión. En las lesiones *in situ* se deben efectuar excisiones con margen de 0.5 cm; en lesiones invasoras de 1 mm o menos, es suficiente un margen de 1 cm; en lesiones de entre 1 a 4 mm de profundidad requieren cuando menos un margen de excisión de 2 cm y en las mayores de 4 mm se recomienda 3 cm de margen. Todas las lesiones localizadas en los dedos, de manos o pies, se tratan mediante amputación, la cual dependerá del sitio y extensión de la lesión. (Tabla 1.3) En general, las amputaciones se realizan proximal a la unión distal del pulgar y a la unión interfalángica de los dedos de la mano; en los dedos del pie, se realiza amputación metatarsofalángica en todos los casos. En cuanto a las linfadenectomías, el lineamiento recomendado actualmente es que en toda lesión mayor a 1.5 mm de invasión deba efectuarse mapeo linfático en busca del ganglio centinela; de encontrarse positivo para metástasis, se realizará linfadenectomía regional. La supervivencia global de los pacientes con melanoma acral lentiginoso es similar a la descrita en los otros tipos de melanoma^{72,48,53}.

Márgenes quirúrgicos de excisión recomendados en Melanoma

Espesor del tumor (mm)	Radio de escisión (cm)
<i>In situ</i> ²	0,3 a 0,5
1	1
1,1 – 2,0	1 - 2
2,1 – 4,0	2
> 4,0	2

Tabla 1.3

PLX4032 (VEMURAFENIB)

El gen BRAF es un elemento clave de mediación en el crecimiento y la división celulares. Las mutaciones en la proteína BRAF V600 están presentes en el 50% de los melanomas y en aproximadamente el 8% de todos los tumores sólidos. La molécula PLX4032, de reducido tamaño y administración oral, fue diseñada para inhibir de forma selectiva dicha mutación. El desarrollo de este fármaco es resultado de un acuerdo alcanzado hace cuatro años entre Roche y Plexikon. Esta segunda compañía participa también con Roche *Molecular Diagnostics* en la disponibilidad del Test cobas® para la Mutación 4800 BRAF V600, con la cual se podrá identificar a los pacientes portadores de la mutación y, en consecuencia, a los candidatos al tratamiento selectivo. El estudio de Roche en fase III (BRIM3) con PLX4032 en pacientes con melanoma que no habían recibido ningún tratamiento previo y cuyo tumor presentó la mutación del BRAF V600, demostró que los pacientes tratados con Vemurafenib, la supervivencia supera los 13.6 meses y casi el 60 % de los pacientes respondió a la terapia^{67,68,78}.

2. OBJETIVOS

General

Determinar la proporción de casos de melanoma maligno cutáneo por morfología, inmunohistoquímica y mutación del gen BRAF en pacientes con diagnóstico de Melanoma en dos centros de referencia (INCAN e INDERMA) en la ciudad de Guatemala del 1 de enero del 2006 al 31 de agosto 2011.

Específicos

1. Identificar Melanomas Amelanóticos a través de pruebas Inmunohistoquímica (HMB45, Melan A y S100).
2. Caracterizar los pacientes con diagnóstico de melanomas por: edad, sexo y localización anatómica (cara, tronco y acral).
3. Identificar la mutación del gen BRAF en la población a estudio por medio de PCR en tiempo real.
4. Describir los casos a estudio de acuerdo al patrón de crecimiento, espesor de Breslow y nivel de CLARK con mayor prevalencia asociados a la mutación del gen BRAF.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Muestras Tisulares: Se seleccionaron 100 casos de bloques de parafina de los Archivos del Instituto Nacional de Dermatología (INDERMA) y del Instituto Nacional del Cáncer (INCAN), de pacientes con diagnóstico de melanoma que consultaron del año 2006 al año 2011 independientemente del sitio de localización del melanoma. Se seleccionaron los casos de los archivos de patología de ambos centros y se sacaron nuevos cortes para su estudio histopatológico y molecular en el laboratorio de patología del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El procesamiento de las muestras para estudios moleculares para la detección de la mutación del gen BRAF fueron realizadas en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre, Madrid, España.

Para el estudio histopatológico, todas las muestras seleccionadas fueron inicialmente fijadas en formol al 10 % bufferado y procesadas con Alcohol, xilol y parafina para su fijación, deshidratación, aclaramiento y posteriormente incluidas en bloques de parafina y cortadas a 3 micras para luego ser teñidas con Hematoxilina y Eosina convencional.¹² Se revisaron los casos para extraer los siguientes datos histopatológicos:

Tipo histológico

Tamaño de la lesión

Morfología citológica

Nivel de Clark

Nivel de Breslow

Fase de Crecimiento

Índice de mitosis

Ulceración

PCR-RT para mutación de BRAF

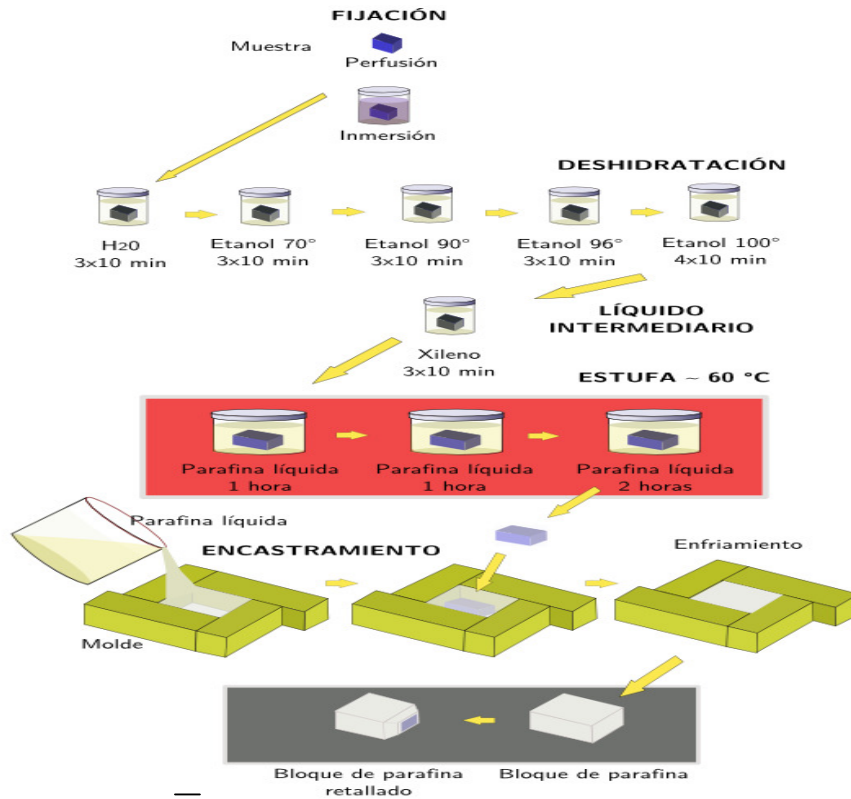


Figura 3.1

Procesamiento de Tejidos

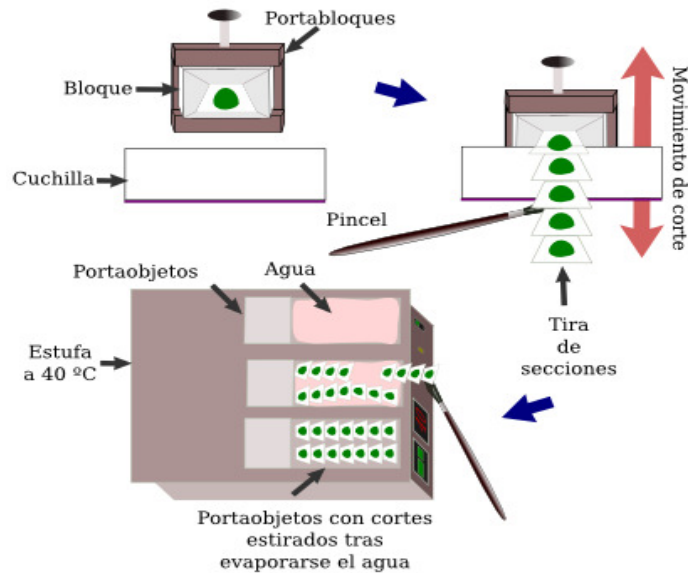


Figura 3.2

Cortes de Tejidos

3.2. Técnica de Inmunohistoquímica

El estudio de inmunohistoquímica se efectuó tratando sobre secciones de material (fijado en formol e incluido en parafina) de 3 micras de grosor colocadas en portaobjetos de carga positiva para ser usados para la técnica de inmunohistoquímica. Para las tinciones de inmunohistoquímica se utilizaron una serie de anticuerpos que se detallan a continuación:

PROTEÍNA	CLON	DILUSION	ORIGEN	DESENMASCARAMIENTO
HMB45	HMB45	1/100	DAKO	Tampón citrato 10 mM Ph8
S100	Policlonal	1/3,000	DAKO	PROTEASA XXIV
Melan A	A103	1/30	DAKO	Tampón citrato 10 mM Ph6.5

Anticuerpos Usados para Melanoma

Tabla 3.1

Los anticuerpo utilizados en el estudio son los recomendados para el diagnostico de melanoma por su principal función biológica y mecanismo de acción. Todas las preparaciones se contrastaron con Hematoxilina (DAKO) y se montaron de manera habitual.

Técnica Envision Peroxidasa (DAKO)

A continuación se describen los pasos a seguir para la tinción de inmuno histoquímica:

1. Bloquear actividad de peroxidada endógena, Añadir peróxido de hidrogeno al 3 % sobre la muestra (Blocking solution DAKO) 5 minutos a temperatura ambiente.
-Lavar con agua destilada o TBS (Tampón DAKO) o PBS
-Este paso se puede hacer en cualquier momento antes de añadir la peroxidada.
2. Bloqueo de proteínas endógenas. Añadir tampón (DAKO) o Albúmina incubar durante 5 – 10 minutos temperatura ambiente.
- Lavar con agua destilada o TBS (Tampón DAKO) o PBS
3. Añadir anticuerpo primario. Añadir anticuerpo primario e incubar durante 30 minutos. Lavar con PBS o TBS

4. Poner a reacción de anticuerpo secundario biotinilado. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar con PBS o TBS
5. Colocación de solución sustrato- cromógeno. Añadir solución preparada del sustrato-cromógeno. Incubar 10 minutos. Lavar con agua destilada.
6. Contra-teñir con hematoxilina DAKO. Encubar de 2 a 5 minutos. Lavar con Agua destilada
7. Deshidratar, aclarar y montar.(etanol y xilol)



Figura 3.3

DAKO Autostainer para la tinción de Inmunohistoquímica.

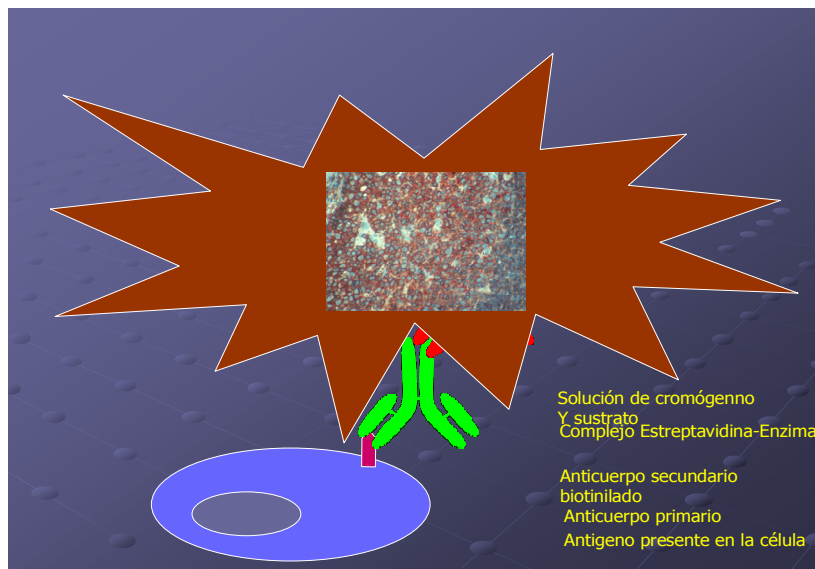


Figura 3.4

Esquema básico de la tinción de inmunohistoquímica.

3. Técnica de PCR-RT para detección de la mutación del Gen BRAF.

Cobas ® 4800 BRAF V600 es una prueba de PCR en tiempo real realizada sobre cobas ® 4800 Sistema, v2.0, que permite seleccionar pacientes de melanoma con tumores tienen la mutación BRAF V600E y candidatos al tratamiento con vemurafenib.¹²

La prueba de efectua sobre ADN extraído de mealnomas fijados en formol e incluidos en parafina. De las secciones se aísla ADN mediante ADN QIAAMPTM FFPE, automatizados sobre el robot QIACUBETM (Qiagen, Hilden, Alemania). Especímenes fueron probados según los procedimientos especificados para todo el método.^{47,68}

Técnica de Extracción de ADN

Previo el asilamiento del ADN y cuantificación con una concentración mínima de 5 ng/ul para realizar la prueba de mutación V600 en BRAF de cobas 4800.

El tejido debe sumergirse en la mezcla DNA TLB/PK

Aislamiento del ADN

A-Mediante un agitador Vortex, mezcle el contenido del tubo que contiene la muestra/mezcla de DNA TLB/PK durante 30 segundos.

B-Coloque el tubo en el bloque de calentamiento en seco a 56 °C e incubelo durante 60 minutos.

C- Mezcle el contenido del tubo mediante un agitador Vortex por 10 segundos.

D-Coloque el tubo en el bloque de calentamiento en seco a 90 °C e incubelo durante 60 minutos

Cada muestra necesita 1 tubo FT y 3 tubos CT y un tubo de elución (tubo para microcentrifuga de 1.5 ml)

E-Deje el tubo enfriar hasta los 15 a 30 °C. Luego realice una centrifugación rápida para recoger el exceso de líquido del tampón

F-Añada 200ul de reactivo de ADN PBB y mezcle el contenido

G-Incuba el tubo a temperatura de 15 a 30 °C por 10 minutos

H-Añada 100ul de isopropanol a cada tubo y mezcle el lisado 3 veces

I-Transfiera todo el lisado al tubo FT/CT debidamente etiquetado

J-Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 x g durante 1 minuto

K-Coloque cada tubo FT en un nuevo tubo CT. Deseche el flujo del tubo CT anterior y elimine el CT anterior

L- Añada 500 ul. del reactivo WB I de trabajo al tubo FT

M- Centrifugue los tubos Ft/CT a 8.000 x g por 1 minuto

N-Deseche el flujo de cada tubo CT en el contenedor de residuos químicos. Vuelva a colocar el tubo FT en el mismo tubo CT.

O-Añada 500ul de reactivo WBII del trabajo al tubo FT.

P-Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 x g durante 1 minuto.

Q-Coloque el tubo FT en un nuevo CT. Deseche el contenido del tubo CT y elimine el tubo CT.

R- Centrifugue los tubos FT/CT a 16.000-20.000 x g durante 1 minuto para secar la membrana del filtro.

S- Coloque el tubo FC en el tubo de elución

T- Añada 100ul de reactivo DNA EB en el centro de la membrana del tubo FT pero sin tocarla.

U- Incube el tubo FT en el tubo de elución a temperatura 15-30 °C durante 5 minutos

V- Centrifugue el tubo FC con el tubo de elución a 8.000 x g durante 1 minuto para obtener la solución de elución del tubo de elución.

W- Cierre los tapones de los tubos de elución.

CUANTIFICACION DEL ADN : Calculo para la solución Stock de ADN de la muestra con concentraciones de 5 ng/ul a 35 ng/ul.

Amplificación y Detección:

Versión desprograma 2.0 para prueba de mutación V600 en BRAF de Cobas Roche 4800 (Manual de Cobas BRAF)

Calculo de dilución para el Stock de ADN de la muestra con concentraciones de 5 ng/ul a 35 ng/ul

A- Para cada muestra se determina la cantidad Stock de ADN requerido en base a la formula (35 ul x 5 ng/ul) concentración de stock de ADN en ng/ul.

B- Para cada muestra se calcula la cantidad de diluyente para muestras de ADN (DNA SD) requerido mediante formula: Concertación stock de ADN=21 ng/ul

Dilución de las muestras:

A- Preparar el numero de tubos necesario para microcentrifuga Safe-Lock de 1.5 ml para diluciones stock de ADN de muestras.

B- Pipetear volumen calculado para el volumen calculado de diluyente para muestras de ADN SD en cada tubo.

C- Agite cada stock de ADN de muestra durante 10 segundos

D- Pipetear volumen calculado para cada stock de ADN de muestras en el tubo etiquetado correspondiente que contenga DNA SD

E. Tape y mezcle cada uno de los stocks de ADN de muestra diluida mezclándolos durante 10 segundos.

Preparación de la Mezcla maestra de trabajo (MMX) La mezcla de oligonucleotidos BRAF y la solución MMX de trabajo son sensibles a la luz..

A. Calculo de volumen RXNMIX por la siguiente formula (numero de muestras +2 controles +1) x 10 ul

B. Calculo de volumen BRAF OM necesario con la siguiente Formula

Volumen BRAF OM necesario = (numero de muestras +2 controles+1) x 8 ul

C. Cálculo de volumen MGAC necesaria con la siguiente formula

Volumen MGAC necesario = (numero de muestras +2 controles +1) x7 ul

D. Obtener viales necesarios de RXNMIX, BRAF OM Y MGAC de la nevera a 2-8 °C. Agitar cada reactivo 5 segundos

E. Añadir volumen calculado RXNMIX en tubo marcado solución MMX

F. Añadir volumen calculado BRAF OM tubo marcado con solución MMX

G. Añadir volumen calculado MGAC al tubo marcado con MMX

Utilizar placas de PCR y plástico sellado para el sistema Cobas 4,800

Añadir 25 ul de control BRAF MUT al posillo A01 de la placa de PCR

Añadir 25 ul de control BRAF WT al posillo B01 de la placa de PCR

Con una pipeta, añadir 25 ul de ADN de muestra diluido empezando por el posillo C01 de la placa de PCR hasta tener todas las muestras colocadas.

Introducir en el equipo y espera resultados. Aproximadamente 1 hora.

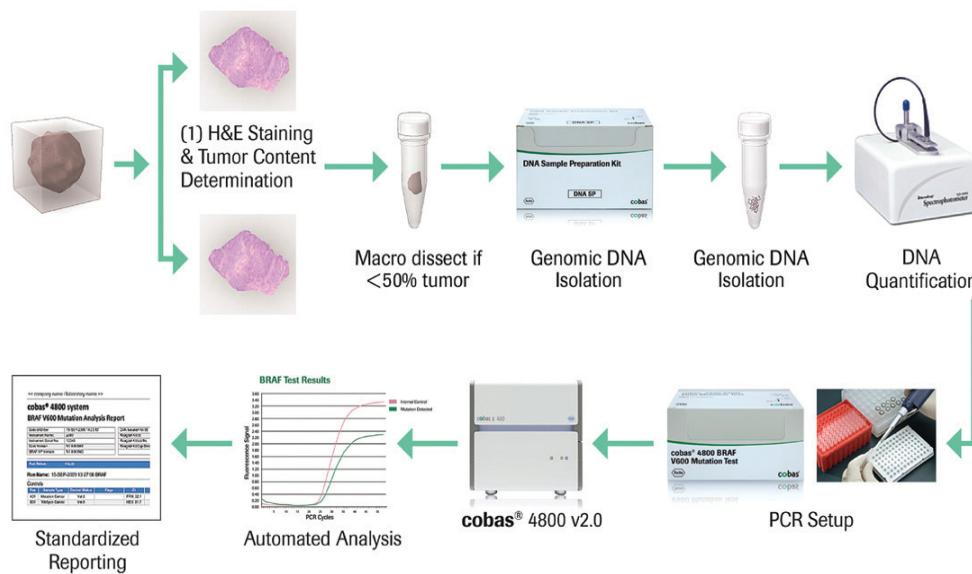


Figura 3.5

Extracción de ADN en bloques de parafina para el método de PCR-RT para detección de la mutación del gen BRAF. 47

3.4. Almacenamiento de Datos

Los datos obtenidos de todos los casos a estudio se incluyeron en una base de datos (aplicación informática Microsoft EXCEL) al igual que los datos histopatológicos y moleculares.

3.5. Estudio Estadístico

Este es un estudio de tipo descriptivo, retrospectivo y prospectivo, en el que se analiza el tipo de melanoma, localización, tamaño, patrón de crecimiento (radial y vertical), presencia de ulceración, mitosis y la presencia de la mutación del gen BRAF. Los casos

fueron recolectados de dos centros de referencia importantes en Guatemala como lo son el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) y el Instituto Nacional de Dermatología (INDERMA). Los casos provenían de lesiones extirpadas entre los años 2006 a 2011. Se descartaron las muestras que no tenían material representativo y valorable así como datos para nuestro estudio.

3.6. Análisis Descriptivo

Se realizó un análisis de tipo Descriptivo, retrospectivo y prospectivo teniendo en cuenta las variables epidemiológicas (edad, sexo) clínicas (localización de los tumores) histopatológicas y variables moleculares.

3.7. Variables de Estudio: Clínicas, histológicas y moleculares

Variable	Tipo de variable	Definición Conceptual	Definición Operacional
Genero	Cualitativa Nominal	Conjunto de pautas de conducta o patrones de relaciones asignadas a cada sexo en las diferentes culturas	Para la obtención F= mujer M= Hombre
Edad	Cuantitativa Discreta	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	De los resultados se procedió a la revisión de expedientes del Instituto de Cancerología y el Instituto de dermatología
Localización anatómica de lesión	Cualitativa Nominal	Área anatómica del paciente que se ve afectada	Área afectada en el cuerpo humano
Mutación del gen BRAF	Cuantitativa Nominal	Cambio de alguna de las bases que conforman el ADN relacionadas con el gen BRAF	PCR- Real Time Con el equipo COBAS y el Kit. de detección de Roche (68)
Medición de Breslow	Cuantitativa Nominal	Medición milimétrica del melanoma que determina la profundidad del tumor desde la epidermis hasta la hipodermis y mas.	Se determina por medio del objetivo ocular con lente milimétrico a partir de la epidermis hasta donde finaliza el tumor en objetivo 10X
Nivel de Clark	Cuantitativa Nominal	Medición de las capas histológicas del Melanoma que se describe desde la epidermis hasta la hipodermis	Valores determinados divididos en I,II,III,IV,V
Crecimiento Radial	Cuantitativa Nominal	Crecimiento horizontal superficial del Melanoma hasta la dermis papilar	Localización de células melanocíticas en la capa epidérmica y dermis papilar superficial
Crecimiento Vertical	Cuantitativa Nominal	Crecimiento vertical del melanoma desde la epidermis dermis e hipodermis y mas	Invasión de células melanocíticas en cualquier capa de la piel

Tabla 3..2

Variables a Estudio

3.8. Cronograma de Actividades

ACTIVIDADES	2010			2011												2012										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
PRESENTACION DEL PROTOCOLO																										
APROBACION																										
TRABAJO DE CAMPO																										
PROCESAMIENTO DE TEJIDOS Y PRUEBAS DE IHQ																										
DETERMINACION DEL GEN BRAF																										
INFORME FINAL																										

Tabla 3.3

4. RESULTADOS

En esta seccion comentaremos las características clinicas, epidemiologicas, histopatologicas y moleculares de los diferentes tipos de melanomas encontrados:

Grafica No. 4.1

DISTRIBUCIÓN DE MELANOMA POR CENTRO DE REFERENCIA

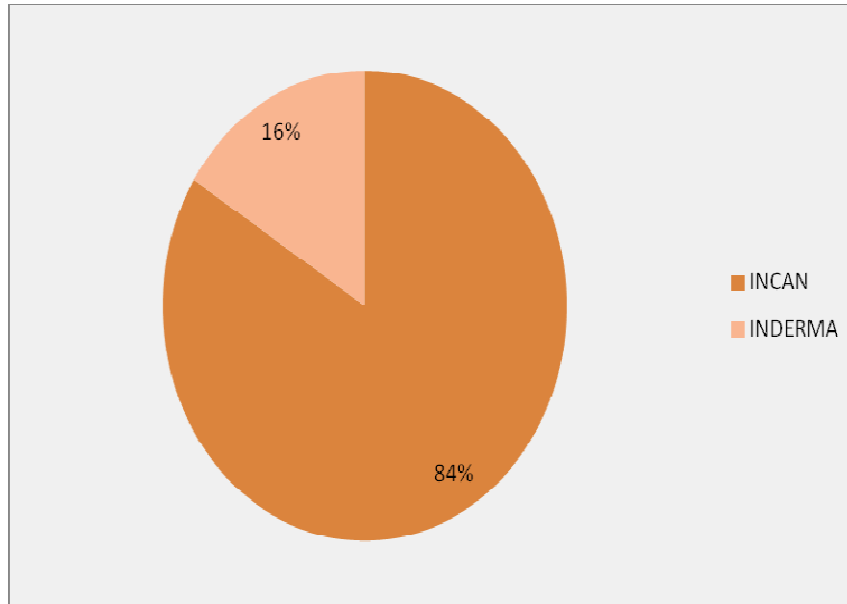


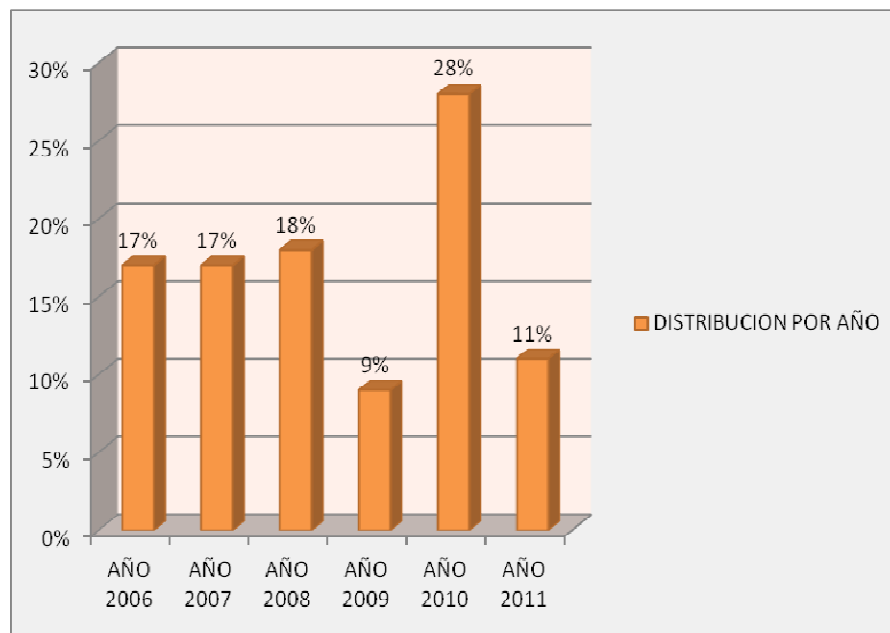
Tabla No. 4. 1

DISTRIBUCION DE CASOS DE MELANOMA POR AÑO

TABLA 1				
AÑO	MELANOMA	TOTAL	%	x 1,000
2006	14	2758	0.51	5.08
2007	13	2858	0.45	4.55
2008	17	2857	0.60	5.95
2009	6	3171	0.19	1.89
2010	25	3160	0.79	7.91

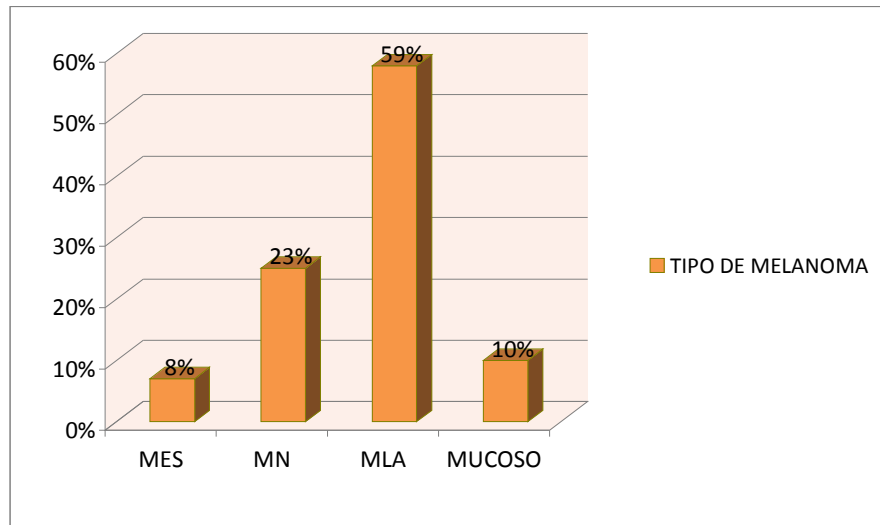
En la tabla No 4.1 y grafica No.4.1 se presenta la descripción de la población guatemalteca a estudio que consultó al Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) e Instituto de Dermatología (INDERMA) por diagnóstico de melanoma durante el periodo de tiempo comprendido de enero de 2006 al 31 de agosto de 2011, donde se observa una proporción promedio de 5.5 por mil habitantes para el diagnostico de Melanoma.

Grafica No. 4. 2
DISTRIBUCIÓN DE CASOS DE MELANOMA POR AÑO



En la gráfica No.4.2 se describe que la proporción de casos con diagnóstico de Melanoma se incrementó del 2006 al 2008 (17 a 18 %), en el año 2009 se observa una disminución de casos con el 9 %, volviendo a incrementarse para el 2010 con un 28 % de casos. El año 2011 no cuenta con datos estadísticos al momento de hacer el análisis por lo que no podemos conocer aún la proporción de casos que se presentaron, por lo que se considera que fue en incremento por el comportamiento en otros años.

Grafica No. 4.3
DISTRIBUCIÓN POR DIAGNOSTICO DE MELANOMA



Según la gráfica No.4.3 por Diagnostico de Melanomas, se pudo observar que el diagnostico de mayor frecuencia en esta población es el Melanoma Lentiginoso Acral (59 %) seguido por el melanoma Nodular con un 23 %, Melanomas de extensión superficial con el 8 % y el melanoma mucoso con un 10 %.

Grafica No. 4.4
DISTRIBUCION POR AÑO Y DIAGNOSTICO DE MELANOMA

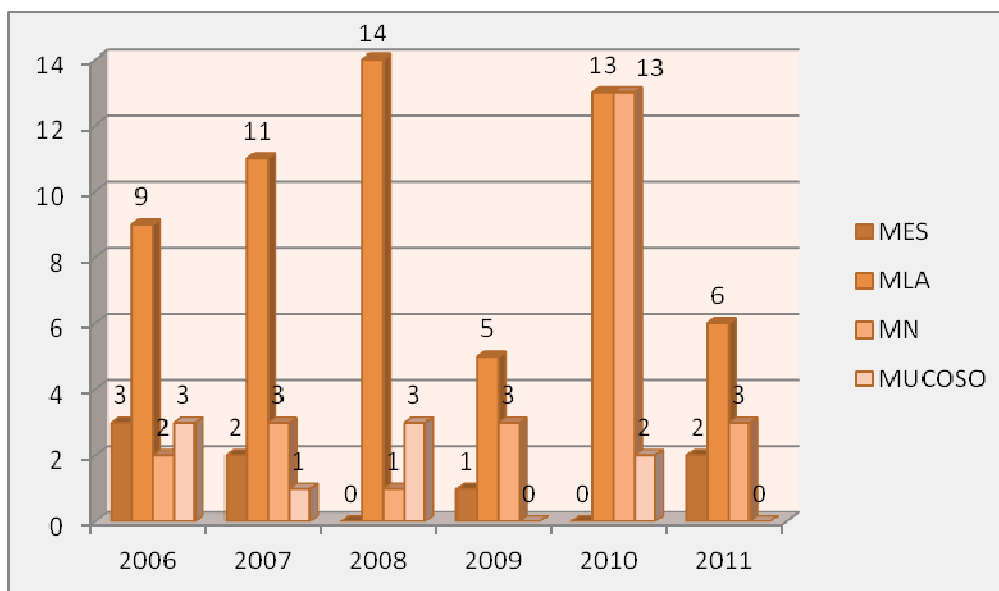


Tabla No. 4.2

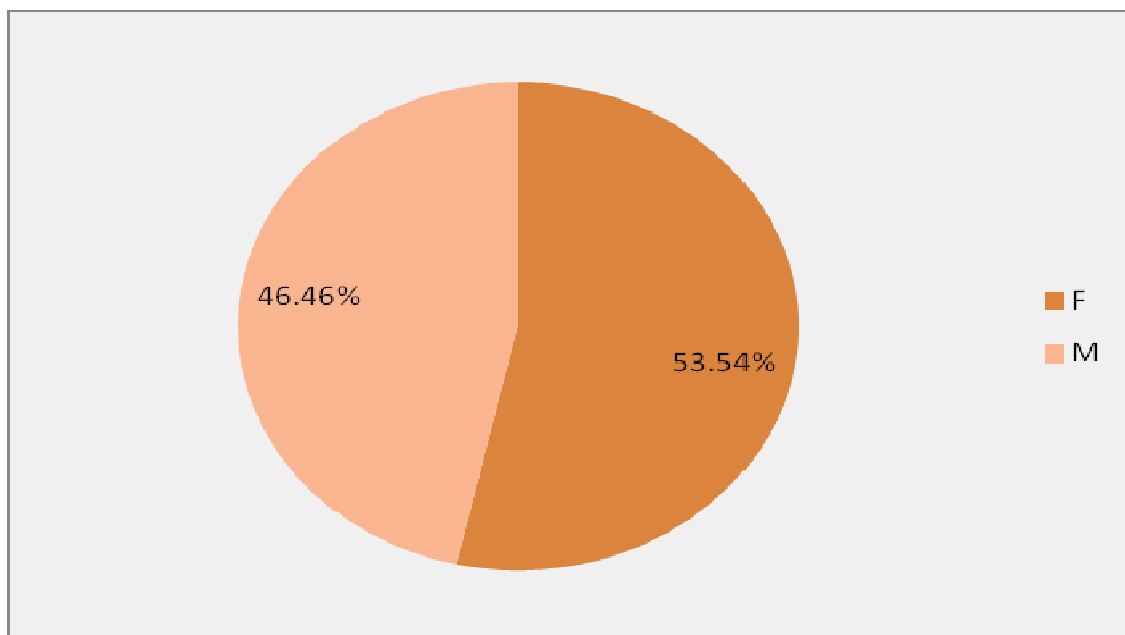
DISTRIBUCION DE CASOS POR DIAGNOSTICO DE MELANOMA Y AÑO

DIAGNOSTICO	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
MES	4	1	0	1	0	2	8
MLA	9	11	14	5	14	6	59
MN	1	3	1	3	11	3	23
MUCOSO	3	2	3	0	2	0	10
TOTAL	17	17	18	9	28	11	100

En la gráfica No. 4.4 y tabla No.4.3 se describe la distribución por año relacionada con el diagnostico de Melanoma, observándose que en todos los años a estudio se presenta el Melanoma Lentiginoso Acral como el principal diagnóstico y para el año 2008 representa un 78 % de los casos. En el año 2010 se observa un incremento significativo de los casos de Melanoma Nodular, ocupando el segundo diagnóstico más frecuente, alcanzando la misma frecuencia que el Melanoma Lentiginoso Acral.

Grafica No. 4.5

DISTRIBUCION DE CASOS DE MELANOMA POR SEXO



Según la Grafica No.4.5 la distribución por sexo muestra que el diagnostico de Melanoma se presentó en el 53.54 % para el sexo femenino y un 46.45 % para el sexo masculino, de los casos estudiados.

Grafica No. 4.6
DISTRIBUCION DE CASOS DE MELANOMA POR EDAD

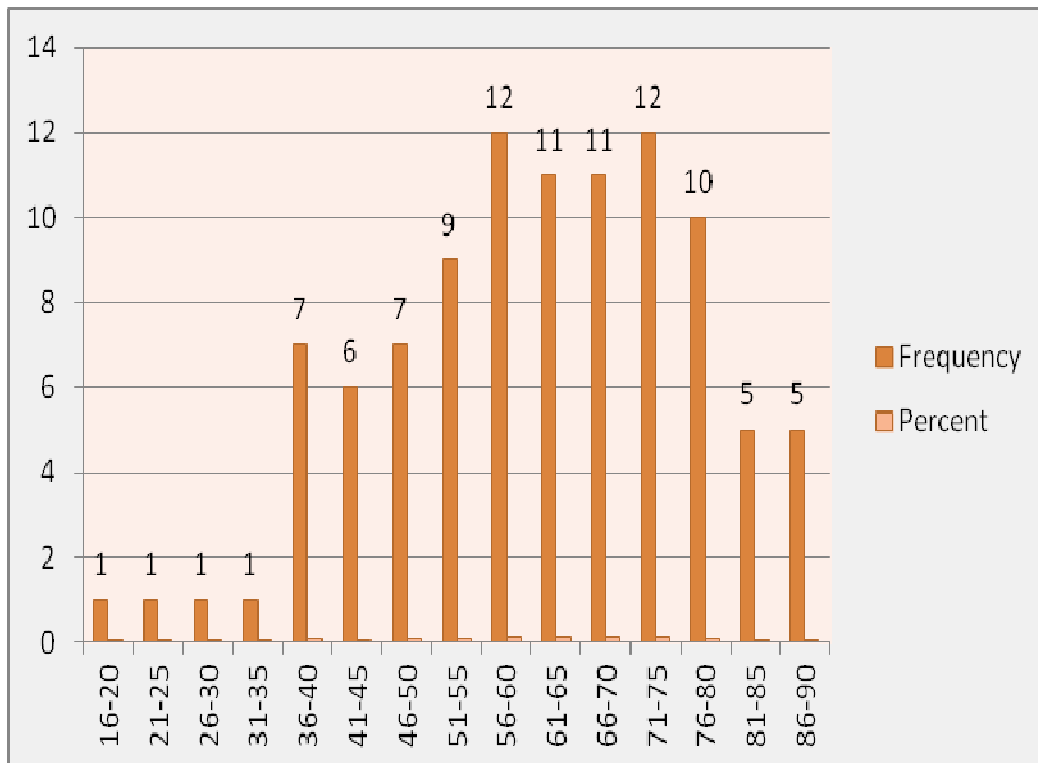


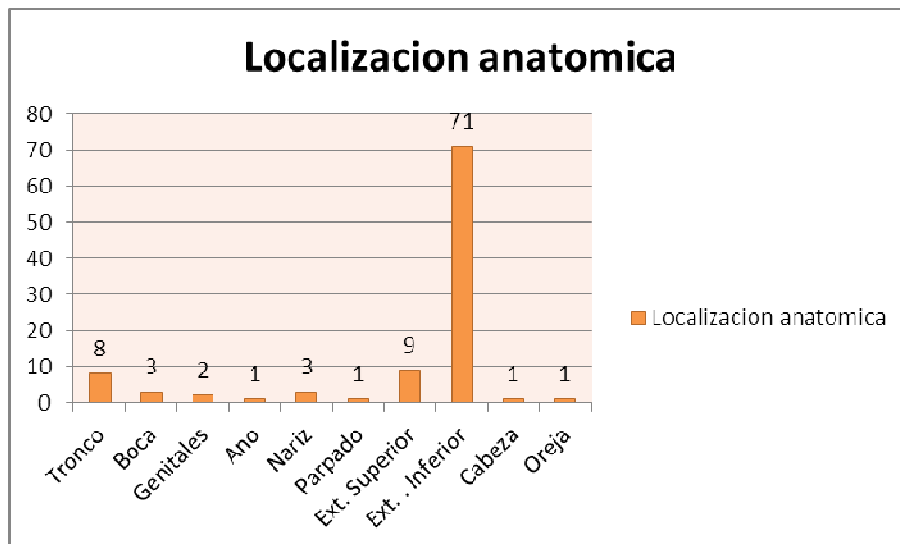
Tabla No. 4.3
DISTRIBUCION DE CASOS DE MELANOMA POR GRUPO DE EDAD

GRUPO/EDAD	Frecuencia	Percentage
16-20	1	1.01 %
21-25	1	1.01 %
26-30	1	1.01 %
31-35	1	1.01 %
36-40	7	7.07 %
41-45	6	6.06 %
46-50	7	7.07 %
51-55	9	9.09 %
56-60	12	12.12 %
61-65	11	11.11 %
66-70	11	11.11 %
71-75	12	12.12 %
76-80	10	10.10 %
81-85	5	5.05 %
86-90	5	5.05 %
TOTAL	99	100.00 %

En la gráfica No.4.6 y Tabla No. 4.3, se observa la distribución con respecto a edad, por rangos, encontrándose la edad media promedio para presentar la enfermedad en hombres a los 61 años de 46 casos y para el sexo femenino es de 57 años de 53 mujeres. El rango de edad se sitúa entre 56-60 años para ambos sexo.

Grafica No. 4.7

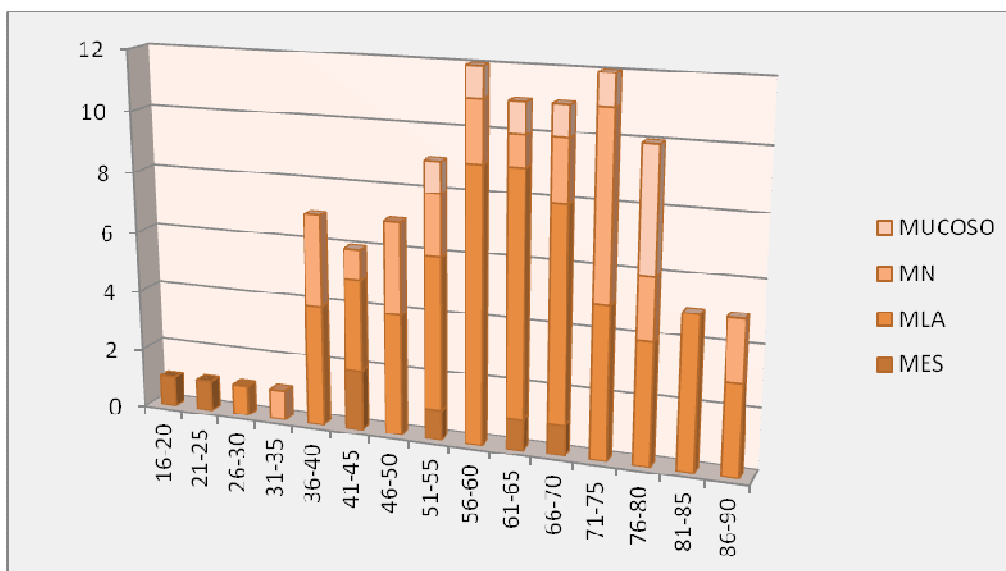
DISTRIBUCION DE MELANOMA POR LOCALIZACION ANATOMICA



En la Grafica No.4.7 por localización anatómica del tumor, se puede observar que de los casos evaluados, el 71 % está representado por melanomas localizados en la extremidad inferior independiente del tipo de melanoma, con un predominio a nivel del pie (plantares y periungueales y falanges), seguido por extremidad superior con el 9 % y el tronco 8%. Se presentaron casos en zonas como la boca y nariz y ano, que pertenecen al grupo de Melanomas Mucosos.

Grafica No. 4.8

DISTRIBUCION DE CASOS POR DIAGNOSTICO



En la Grafica No. 4.8 y tabla No. 4.4 se observa la distribución por edad y tipo de Melanoma diagnostico de 100 casos. Se observa que en edades tempranas de la vida el diagnostico de melanoma es menos frecuente, presentándose el Melanoma Lentiginoso Acral principalmente en edades tempranas hasta pacientes de 90 años siendo este el melanoma de más alta prevalencia de los casos, seguido por el Melanoma Nodular en pacientes adultos.

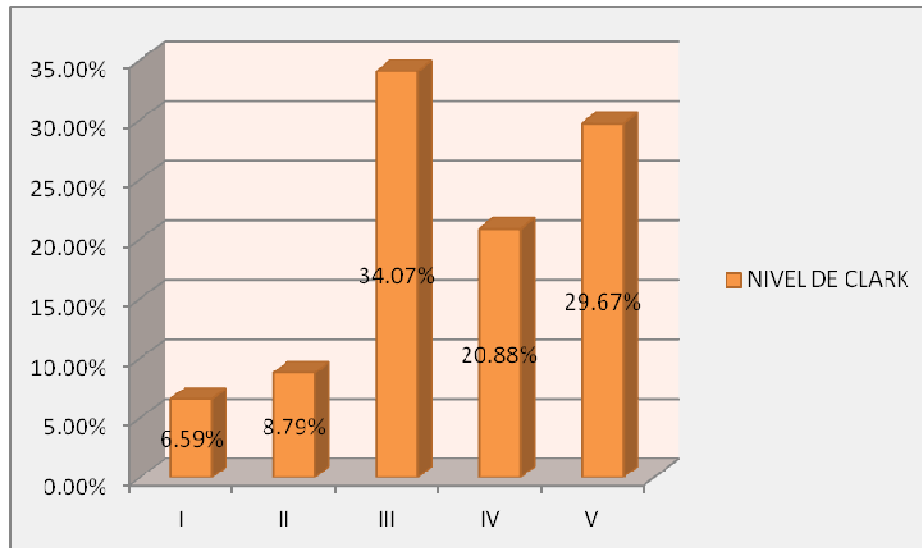
Tabla No. 4.4

DIAGNOSTICO DE MELANOMA POR GRUPO DE EDAD

GRUPO DE EDAD	MES	MLA	MN	MUCOSO	Total
16-20	1	0	0	0	1
21-25	1	0	0	0	1
26-30	0	1	0	0	1
31-35	0	0	1	0	1
36-40	1	5	2	0	7
41-45	2	3	1	0	6
46-50	0	4	3	0	7
51-55	1	5	2	1	9
56-60	0	9	1	1	12
61-65	0	8	1	2	12
66-70	2	7	1	1	11
71-75	0	5	6	1	12
76-80	0	4	2	4	10
81-85	0	5	0	0	5
86-90	0	3	2	0	5
TOTAL	8	59	23	10	100

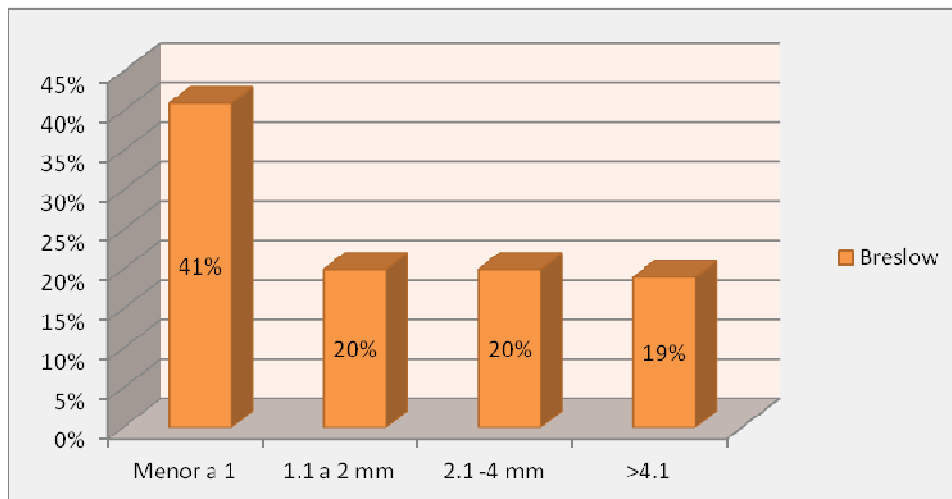
Grafica No. 4.9

DISTRIBUCION DE CASOS DE MELANOMA POR NIVEL DE CLARK



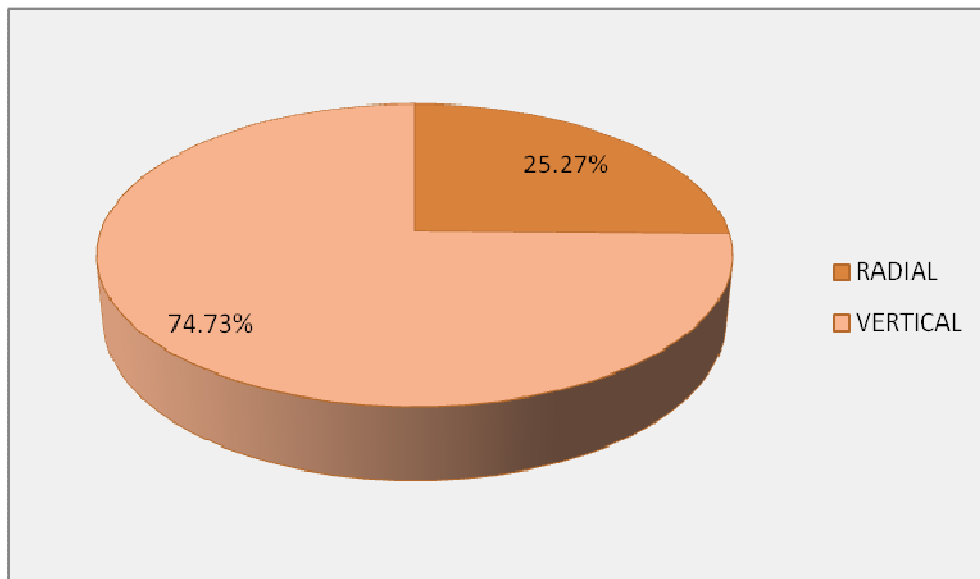
Grafica No. 4.10

DISTRIBUCION DE CASOS DE MELANOMA POR EL ESPESOR DE BRESLOW



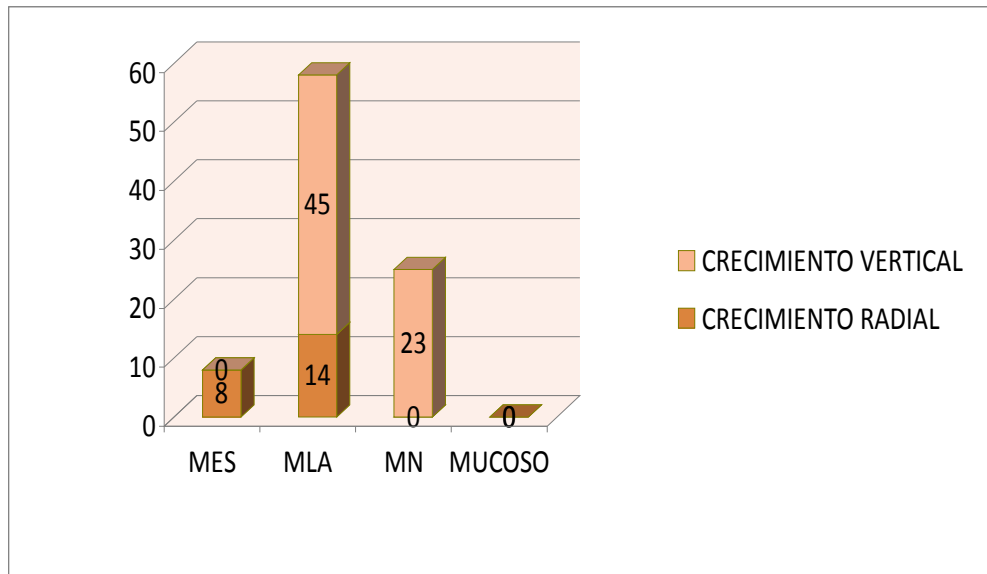
En las graficas No.4.9 y No.4.10 se describe el nivel de Clark, observándose que el 34 % se encontraba en el nivel III, seguido por el nivel V. En esta grafica se observa que la mayor parte de los casos estaban localizados en la dermis papilar y reticular El espesor de Breslow nos muestra que el tamaño del tumor predominante es de menos de 1 mm (41 % de los casos) que un 20 % de los tumores miden hasta 2 mm. Un 20 % son tumores entre 2.1 a 4 mm y un 19 % con tumores mayores a 4 .1mm. Estos últimos representan un 59 % de los casos mayores de 1.1 mm encontrándose en estadios más avanzados de la enfermedad y pobre pronostico y más alta probabilidad de metástasis.

Grafica No. 4.11
DISTRIBUCION DE CASOS DE MELANOMA POR PATRON DE
CRECIMIENTO



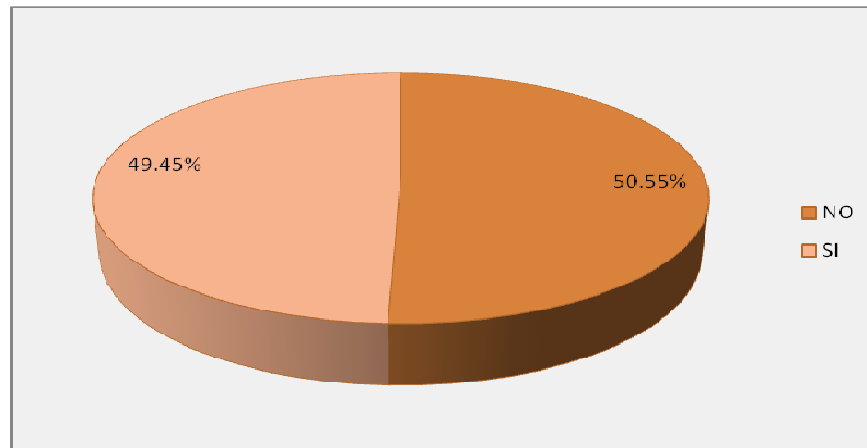
En la gráfica No.4.11 nos muestra el patrón de crecimiento del melanoma de los casos a estudio en el cual se evidencia que el patrón de crecimiento de tipo vertical representa el 74.73% El patrón de crecimiento radial fue de 25.27% del total de los casos, que representa el grupo de mejor pronóstico y curación de la enfermedad. En los Casos de Melanoma Mucosos no se describe esta clasificación

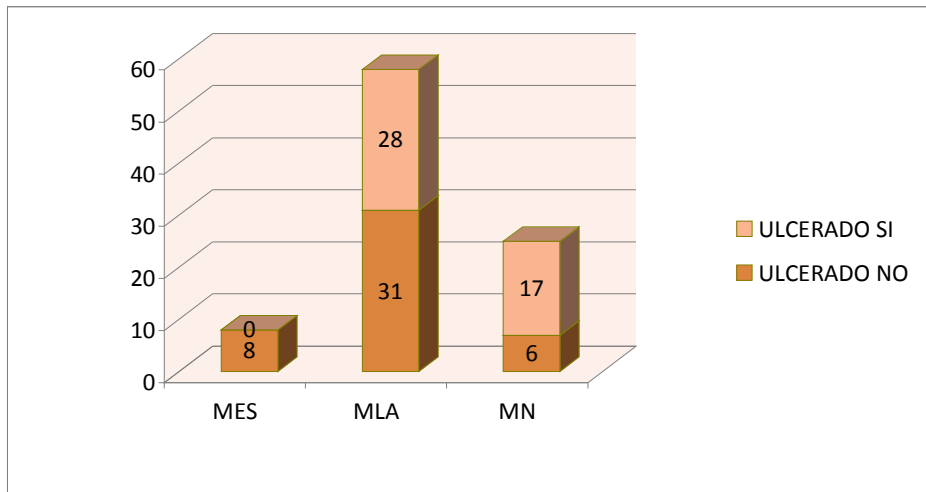
Grafica No. 4.12
DISTRIBUCION DE MELANOMAS POR DIAGNOSTICO Y PATRON DE CRECIMIENTO



En la grafica 4.12 podemos observar que las variables de patrón de crecimiento y tipo de Melanoma, muestra que para los de tipo de Melanoma Nodular y Melanoma Lentigo acral predomino el patrón de crecimiento vertical.

Grafica No. 4.13
DISTRIBUCION DE CASOS DE MELANOMA CON PRESENCIA DE ULCERA

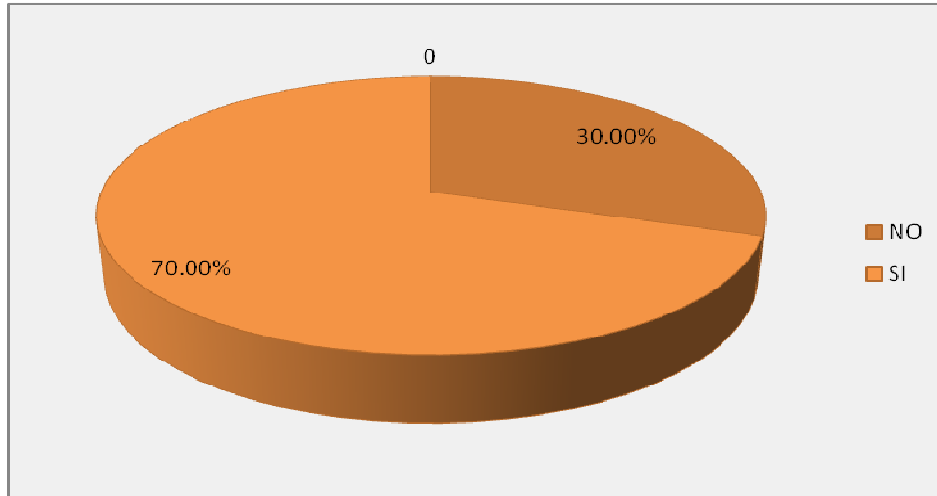


Grafica No. 4.14**DISTRIBUCION DE MELANOMA POR DIAGNOSTICO Y PRESENCIA DE
ULCERACION**

En las gráficas No. 4.13 y No.4.14 se describe la asociación de variables entre presencia de ulceración y tipo de Melanoma, encontrándose el 50.5% sin ulceración y un 49.5 % con presencia de ulceración. La presencia de ulcera se considera de mal pronóstico. Los melanomas de Extensión superficial no presentaron ulceración, sin embargo los melanomas Lentiginosos Acrales presentaron ulceración en 28% y los melanomas Nodulares en un 17 % del total de los casos.

Grafica No. 4.15

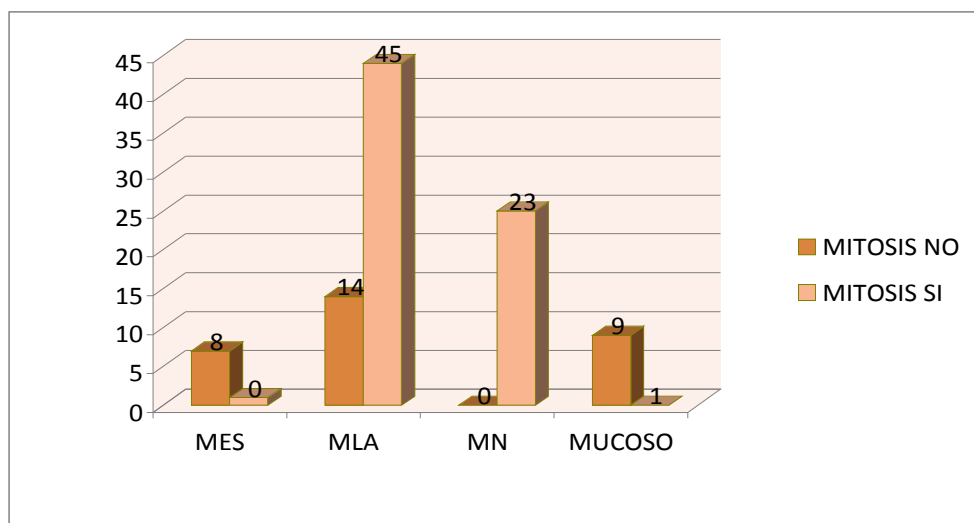
DISTRIBUCION DE MELANOMA POR PRESENCIA DE MITOSIS



En la grafica No.4.15 observamos la distribución de melanoma por presencia de mitosis observándose el 70 %, de los cuales el Melanoma Lentigo Acral y el Melanoma Nodular si estaba presente esta variable.

Grafica No. 4.16

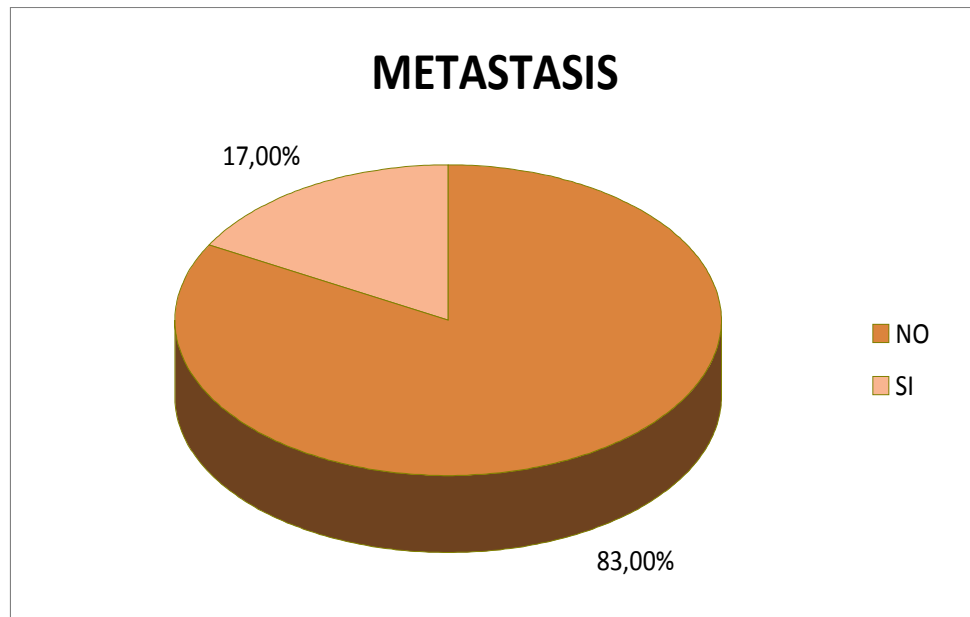
DISTRIBUCION DE MELANOMA POR PRESENCIA DE MITOSIS Y TIPO DE MELANOMA



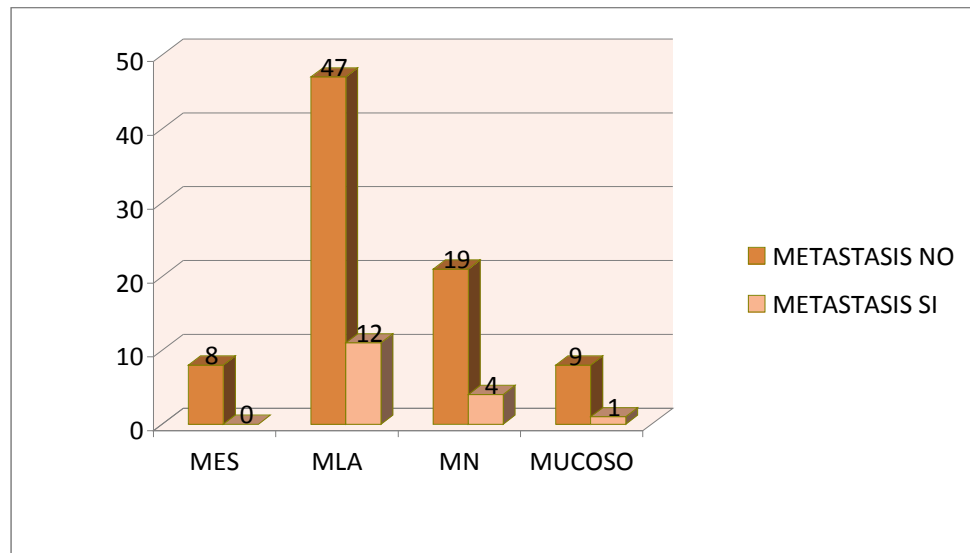
La gráfica No.4.16 nos da información de las variables de tipo de Melanoma y presencia de mitosis, en la cual poder observar que en los melanomas es frecuente la presencia de mitosis. Por diagnostico podemos ver que los melanomas con mas figuras de mitosis fueron aquellos con mayor espesor de Breslow, con un promedio de 5 a 6 mm² en melanomas ulcerados y con un índice de Breslow superior a 3mm tanto en melanoma Lentigo maligno como el Melanoma Nodular, y crecimiento vertical. Los tumores que no presentaron mitosis se encuentran en el grupo de Melanomas de extensión superficial y con crecimiento radial con un 30 % de los casos.

Grafica No. 4.17

DISTRIBUCION DE MELANOMA Y PRESENCIA DE METASTASIS

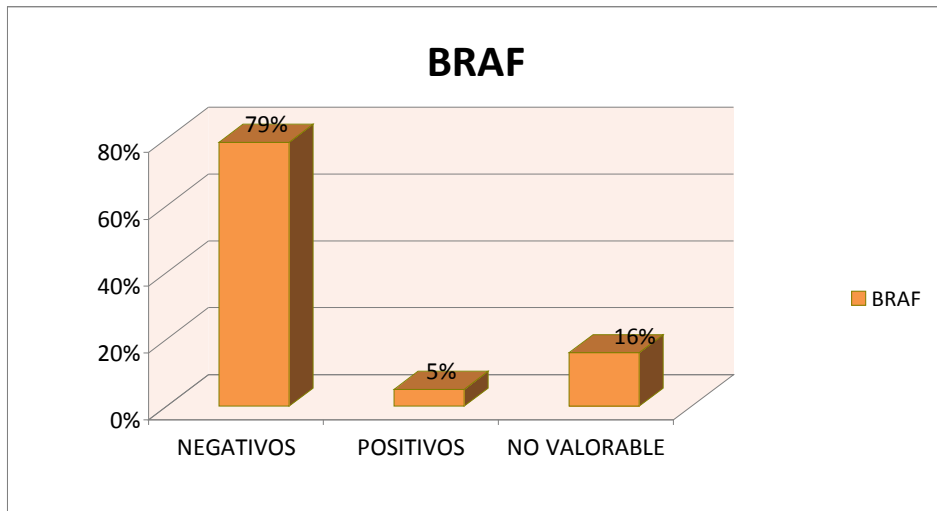


Grafica No. 4.18
DISTRIBUCION DE CASOS DE MELANOMA POR DIAGNOSTICO Y
PRESENCIA DE METASTASIS



En la grafica No. 4.17 y No.4.18 se observa la presencia de metástasis en la cual se describe un 17 % de los casos a estudio fueron positivos principalmente a ganglios regionales y un 83 % no reportaron presencia de metástasis a ganglios regionales ni a distancia. El melanoma Nodular y Melanoma lentiginoso Acral presentaron metástasis y solamente un caso de melanoma mucoso.

Grafica No. 4.19
DETERMINACION DE LA MUTACION DEL GEN BRAF

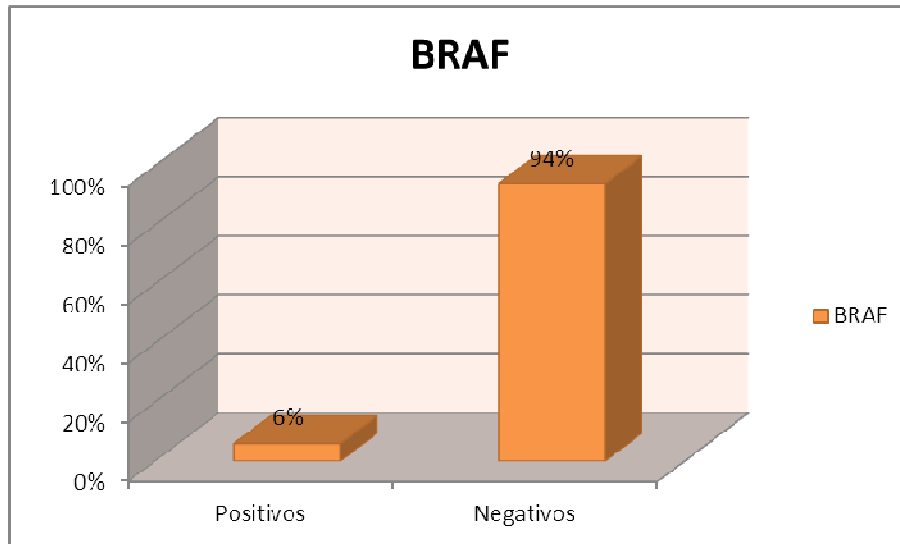


En la Grafica No. 4.19 podemos observar que se procesaron 100 muestras para determinar la mutación del Gen BRAF . La detección de la mutación de BRAF se esta realizando por medio de la prueba de Cobas ® 4800 BRAF V600E es una prueba de PCR en tiempo real realizada sobre cobas, ® 4800 Sistema, v2.0. De los casos procesados se encontró que el 79 % de las muestras fueron negativos ya que no estaba presente la mutación y únicamente en el 5 % de los casos se presento la mutación. El 16 % de los casos se detectaron no valorable que ocurre cuando la calidad del ADN de la muestra ha sufrido alteración y no es adecuada para el estudio.

En la Grafica No. 4.20, la presencia de mutación del gen BRAF representa el 6% de los casos evaluados y el 94 % de los casos, no presenta la mutación del gen.

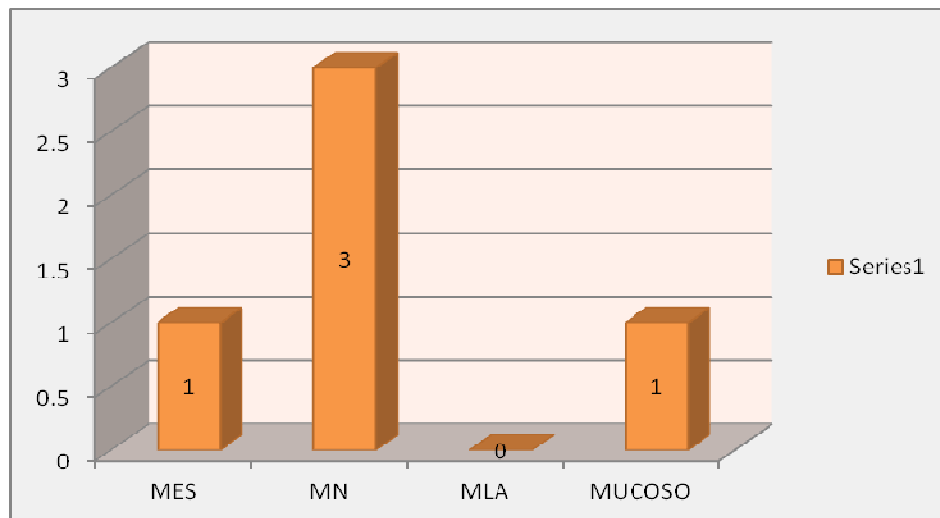
Grafica No. 4. 20

DISTRIBUCION DE MELANOMA POR PRESENCIA DE MUTACION DEL GEN BRAF



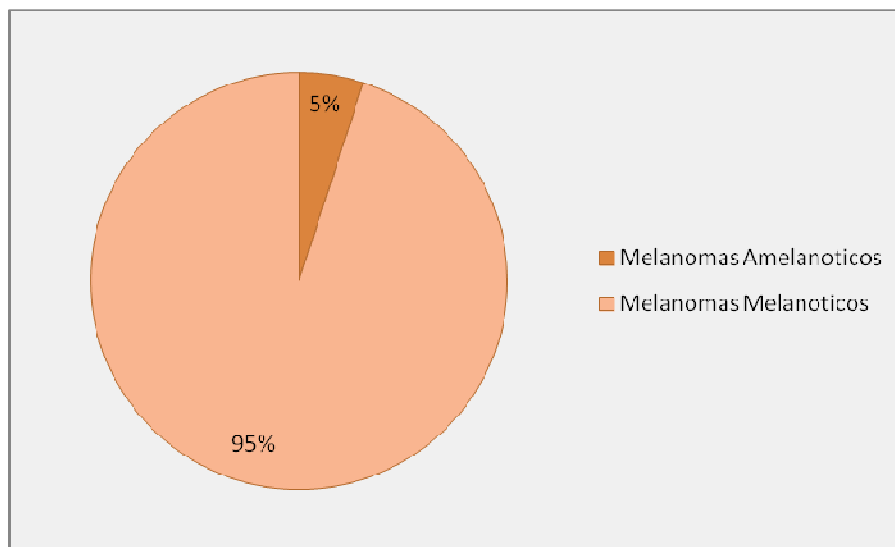
Grafica No. 4. 21

DISTRIBUCION DE MELANOMA POR PRESENCIA DE MUTACION DEL GEN BRAf Y DIAGNOSTICO



En la Grafica No. 4.21 los casos positivos para mutación del gen BRAF se puede describir que tres casos pertenecen a melanoma nodular. Se presento un caso de MES y un caso de Melanoma Mucoso. Este ultimo es una mutación muy rara pero se que considera como importante el hallazgo ya que son muy poco los casos reportados.

Grafica No. 4.22
DISTRIBUCION POR PRESENCIA DE MELANOMAS
AMELANOTICOS



En la Grafica No.4.22 podemos encontrar que el 5 % de los casos se presentaron como melanomas amelanoticos por lo que se necesito hacer estudios de inmunohistoquímica como S100, HMB45 y Melan A para confirmar el diagnostico, encontrándose para los 5 casos positividad. Se observó que dos casos de MN, un caso de MES y dos casos de MLA. No se encontró ningún caso de melanoma mucoso. El 95 % de los casos se encontró que eran melanomas pigmentados.

5. DISCUSION

5.1 Factores Epidemiológicos e Histopatológicos

El Melanoma cutáneo en las últimas décadas ha incrementado su incidencia en la población de raza blanca más que ningún otro tipo de cáncer, siendo el responsable de casi el 90% de las muertes producidas por tumores cutáneos malignos. En todo el mundo cada año se diagnostican cerca de 160,000 casos nuevos de melanoma y de acuerdo con la OMS cada año fallecen 57,000 personas por melanoma.³⁴ La incidencia de melanoma para Europa es de 6-14 por 100,000 habitantes, en USA es de 10 a 25 por 100,000 habitantes y en Australia y Nueva Zelandia es de 50 a 60 por 100,000 habitantes.^{36,34.}

El presente estudio fue realizado en la ciudad de Guatemala. Se hizo una revisión de 100 casos en dos centros de referencia INCAN (Instituto Nacional de Cancerología) e INDERMA (Instituto Nacional de Dermatología y Cirugía) de los años comprendidos del 2006 al 2011. Se seleccionaron los casos de los archivos de patología de ambos centros y se obtuvieron cortes para su estudio histopatológico y molecular en el laboratorio de patología del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Las muestras para estudios moleculares para la detección de la mutación del gen BRAF fueron realizadas en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España.

De los casos a estudio el 84 % de la población correspondían al INCAN (Instituto Nacional de Cancerología) y un 16 % al INDERMA (Instituto de Dermatología), Siendo la proporción de casos de melanoma de 5.5 por cada mil habitantes.⁴⁰

En cuanto a la proporción por tipos, es bien conocido que el melanoma lentiginoso acral supone el 10% de los melanomas, generalmente aparece alrededor de los 65 años y es más frecuente en varones. La localización más frecuente es la planta del pie.³⁴ En nuestra serie el tipo de melanoma mas frecuente fue el **Melanoma lentiginoso acral** con un 59 % de casos localizado principalmente en el pie, región plantar y peri ungueal y falanges. Este tipo de melanoma se ha descrito también como el más frecuente en México y en poblaciones africanas y asiáticas. En Guatemala la raza predominante es la

raza indígena representando más del 60 % de la población. Se han realizado algunos estudios sobre el origen de los indígenas en America confirmandose la teoría sobre la migración de pueblos asiáticos por el estrecho de Bering^{15,20}. Se han realizado estudios de ADN mitocondrial entre pueblos indígenas americanos y asiáticos que han demostrado su relación²⁰. En la población africana y asiática se ha descrito una incidencia de hasta un 35 a 90 % siendo el mas frecuente⁴⁵.

En nuestra población el diagnóstico de melanoma es difícil, sobre todo, al inicio de la neoplasia, ya que ésta suele confundirse con verrugas, hongos, hemangiomas, hematomas y queratosis seborreica, entre otros; por eso su detección se puede demorar el tumor en edad avanzada. Los melanomas en etapa temprana, en la que son potencialmente curables, tienen un aspecto *sui generis*. En el presente estudio no se encontraron casos de Melanoma Lentigo Maligno que regularmente se presentan en personas de piel blanca y expuesta al sol en zonas como la cara. El **Melanoma de Extensión Superficial** constituye el 70% de los melanomas y es el tipo de melanoma cutáneo más frecuente a nivel mundial³⁴. En mujeres aparece más frecuentemente en las piernas, y en la parte superior de la espalda en los hombres y fundamentalmente entre los 40-50 años³⁴. En la población guatemalteca se encontró sólo en un 8% de la población, siendo este el de menor frecuencia en el presente estudio.

El **Melanoma Nodular** es el segundo subtipo más frecuente representa un 15-30% de la población mundial. Afecta a todas las razas y más al hombre que a la mujer. Suele iniciarse sobre los 50 años, siendo sus localizaciones más frecuentes en el tronco, la cabeza y el cuello³⁴. El **Melanoma Nodular** en nuestra serie se observó en el 23 % de la población Guatemalteca, ocupando el segundo lugar de frecuencia tras el melanoma lentiginoso acral, como ocurre en otras poblaciones.

El **Melanoma de Mucosas** representa en la población mundial menos del 4% . Es un tumor de evolución más agresiva, localizado en las mucosas de la región cérvico-facial, el aparato genital femenino, la zona anorrectal y las vías urinarias; es más frecuente en mujeres y generalmente aparece en la séptima década de la vida. El Melanoma de Mucosas en la población guatemalteca de nuestra serie, se presento en el 10 % de los casos, siendo mas frecuente en mucosas de la cara (boca, nariz y parpado). No se encontró predominio de sexo, observándose primordialmente en la séptima década de la vida.

En relación al sexo hay algunos autores que no consideran que exista un predominio en hombres o mujeres y que el melanoma se desarrolla en las mismas proporciones, sin embargo hay algunos que han descrito que la mujer suele ser el sexo mas afectado y en lugares como en México se ha llegado a describir una relación de 8:1 para el sexo femenino⁶¹. En nuestra serie encontramos un ligero incremento de 53.54 % en el sexo femenino y 46.46% en para el sexo masculino. Esto puede deberse a que la mujer consulta mas rápido que el hombre a los centros asistenciales.

El Rango de edad de nuestra serie fue de 61-65 años y la edad promedio para hombres fue de 61 años y para la mujer en 57 años. Según los datos observados en nuestro estudio podemos decir que en el Melanoma Lentigo Acral la edad promedio fue de 65 años ⁴⁵ mientras que en el MES fue en pacientes mas jóvenes (< de 50 años) . El Melanoma Lentiginoso Acral y nodular se presento en pacientes entre 31 a 90 años sin predilección de la edad. Mientras que en el Melanoma de mucosas se desarrollo después de los 70 años.

En relación a localización anatómica del Melanoma encontramos un predominio en la extremidad inferior con el 71 %, seguido del 9 % localizado en la extremidad superior y 8% en el tronco. En la raza blanca, la localización del melanoma cutáneo varía según el sexo ³⁴. Analizando a nivel mundial los nuevos casos de melanoma cutáneo entre 1998 y 2002, se confirman los patrones habitualmente descritos de localización predominante en la piel del tronco en el hombre y la zona inferior de las piernas en las mujeres, patrones atribuidos inicialmente a las zonas de exposición solar según el tipo de ropa utilizada por cada sexo³⁴.

Otro patrón descrito es el relacionado con la edad en el momento del diagnóstico y el tipo de exposición solar; así en los adultos jóvenes, las localizaciones predominantes son el tronco y las extremidades lo que podría indicar que las exposiciones intermitentes e intensas a la radiación ultravioleta durante la infancia se asocian a la aparición de melanoma cutáneo en los primeros años de la vida adulta. En las edades más avanzadas la localización predominante es en la cabeza y en el cuello, lo que asociaría su aparición con una exposición más crónica)²².

En nuestra serie la distribución de casos por nivel de Clark se observó predominantemente en el nivel III con un 34.07 % de los casos seguido por el nivel V

con un 29.67 %. Los niveles I y II fueron los de menor proporción. Los niveles IV, V, representaban el 50 % de los casos, lo que indica un pobre pronóstico y con capacidad de metástasis.

Actualmente para evaluar el factor pronóstico de la AJCC, se utiliza un sistema de estadificación de los enfermos con melanoma basado en el estudio del TNM que mediante la utilización de datos clínicos y histológicos en relación a las características del tumor (espesor y presencia o no de ulceración), presencia y número de ganglios linfáticos afectos y las características de estos (micrometástasis o macrometástasis) y la presencia o no de metástasis a distancia, permite clasificar a los melanomas en los estadios clínicos dividiendo a los pacientes en los que tienen la enfermedad localizada (estadios I y II) con enfermedad ganglionar y regional (estadio III) y con metástasis a distancia (estadio IV) este sistema de estadificación permite clasificar a los pacientes en subgrupos homogéneos facilitando su inclusión en ensayos clínicos y la comparación de resultados así como facilita la información pronóstico. El espesor de Breslow se considera el factor pronóstico mas importante, siendo la ulceración el segundo factor pronóstico en importancia¹⁴. En el presente estudio se observó que el índice de Breslow en el 41 % de los tumores era menor de 1 mm, se encontraban en un Estadio I con una tasa de supervivencia a 5 años de 97 a 79 %¹⁴. Un segundo grupo de tumores lo constituían aquellos comprendidos en el estadio II, con tumores comprendidos entre 1.1 a 2 mm de espesor, que comprenden en nuestra serie un 20 %, sin metástasis a ganglios, con una tasa de supervivencia a 5 años del 82-53 %. El tercer grupo en estadio III con tumores comprendidos entre 2.1 a 4 mm, observándose en el 20 % de los casos con una tasa de supervivencia a 5 años de 78-40%. El cuarto grupo de casos en estadio IV se encontró con tumores que median más de 4 mm, los cuales corresponden al 19 % de los casos.¹⁴

En relación a la presencia de ulcera, en nuestra serie se observó que el 50 % de los casos no presentaban ulceración, mientras que el 49.45 % si estaba presente. Ninguno de los Melanomas de Extensión Superficial presentaron ulceración. En los Melanomas Lentiginosos Acrales se observó en 28 % y 17 % en Melanomas Nodulares. Este hallazgo macroscópico es de importancia pronóstica ya que indica un comportamiento mas agresivo cuando esta presente.

Otra de las variables a estudio es la presencia de mitosis, encontrándose en nuestro estudio en un 30 % de los casos, principalmente en Melanoma Lentigo Acral y Melanoma Nodular. En melanomas de extensión superficial no estaba presente al igual que los melanomas mucosos o era mínima.

El riesgo de presentar metástasis en ganglios regionales o viscerales es directamente proporcional al espesor tumoral. Los ganglios linfáticos regionales son la primera localización metastásica en el 65% de los pacientes y son un factor predictivo importante del desarrollo de metástasis viscerales y por tanto un factor de mal pronóstico. Las metástasis viscerales más frecuentes son a pulmones, hígado, cerebro y huesos. La presencia de Metástasis a ganglios regionales en nuestra serie fue de 17 % . En el 83 % de los casos no estaba presente al momento del diagnostico ni posteriormente. De los casos que presentaron metástasis encontramos que el 70.5 % pertenecían a Melanoma Lentigo Acral y 23.5 % a Melanoma Nodular y el 6 % a melanomas mucosos.

5.2 Determinación de BRAF

El melanoma se produce como resultado de complejas interacciones de factores genéticos y ambientales. El riesgo individual para el desarrollo de este tumor está determinado por la presencia de mutaciones heredadas o polimorfismos en los genes asociados a melanoma y por la magnitud de la exposición solar aguda o crónica recibida a lo largo de la vida. La mutación de BRAF es la alteración molecular mas frecuente en el Melanoma se ha descrito del 30 al 70 % principalmente en aquellos sin piel con exposición crónica solar⁵⁰. Aproximadamente el 40 al 60 % de la población caucásica tiene activa esta mutación principalmente en V600E . En el melanoma las alteraciones genéticas son principalmente la inactivación de genes supresores de tumores como *CDKN2A/p14ARF*, *CDKN2B* y la activación del oncogén *BRAF*. La mutación de BRAF solamente activa la vía de MAP Cinasa lo que produce perdida de PTEN. El gen *CDKN2A* codifica dos proteínas: p16 que se une a las cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4 y CDK6) inhibiendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb). Al inactivarse p16 se fosforila Rb y se activa el ciclo celular, favoreciendo la progresión de G1 a S. La otra proteína codificada por *CDKN2A* es p14ARF que inhibe el ciclo celular a través de p53, actuando también como un gen supresor de tumores. Este gen, de alta penetrancia, es responsable de un 39% de mutaciones encontradas en el

melanoma familiar. *BRAF* es un oncogén que, localizado en 7q34, está implicado en la vía de señalización Ras/RAf/MAPK que regula la respuesta celular a partir de las señales emitidas por los receptores de factores de crecimiento.^{47,70,75,76,62}

La detección de la mutación de BRAF se realizó por medio de la prueba de Cobas® 4800 BRAF V600 es una prueba de PCR en tiempo real realizada sobre cobas,® 4800 Sistema, v2.0, que permite seleccionar pacientes de melanoma con mutación BRAF V600E y candidatos al tratamiento con vemurafenib.¹² Curtin et al.¹⁹ dividieron a los melanomas cutáneos y mucosos en los siguientes 4 grupos relacionados con distintos patrones de exposición solar y diferente localización anatómica: 1) melanomas sobre piel sin daño solar crónico (o melanoma relacionado con la exposición solar intermitente); 2) melanomas sobre piel con daño solar crónico (que corresponderían fundamentalmente al melanoma sobre lentigo maligno); 3) melanomas acrales, y 4) melanomas de mucosas. Hallaron que, mientras el 81% de los melanomas en piel sin daño solar crónico tenía mutaciones de BRAF o de NRAS (que eran mutuamente excluyentes), la mayoría de los melanomas de los otros tres grupos, los tres con un patrón histológico lentiginoso, no presentaban mutaciones de estos genes, pero sí amplificaciones de los genes CDK4 y CCND1 (ciclina D1) y/o aberraciones genéticas de c-Kit que incluían mutaciones y amplificaciones.^{19,18.}

La Mutación del gen BRAF en la proteína V600E en este estudio se encontró únicamente en el 6% , siendo el 94 % “Wild Type” para BRAF. De los casos que presentaron la mutación a BRAF V600E es importante mencionar que correspondían a Melanoma Nodular y Melanoma de Extensión Superficial y Melanoma de Mucosas. La causa de la baja incidencia de BRAF en nuestra serie probablemente se deba a que el 59 % de los casos correspondían a Melanoma Lentigo Acral en los cuales se ha descrito muy baja las mutaciones para BRAF. De hecho no se encontró ningún caso de Melanoma Lentigo Acral positivo.

Se ha descrito que la mutación de BRAF en Melanomas de mucosas en menos del 10 % y es casi ausente, sin embargo de los casos que presentaron la mutación se encontró un caso positivo en una paciente de 74 años, localizado en la boca.

5.3 Marcadores de Inmunohistoquímica

La histopatología continúa siendo el Gold-Standard en el diagnóstico de melanoma. La mayoría de melanomas no requiere de marcadores de inmunohistoquímica para su

diagnóstico. Sin embargo, algunos subtipos, como los melanomas de células fusiformes, el melanoma amelanótico y los melanomas metastáticos, requieren de dichos estudios para su diagnóstico exacto. Los anticuerpos contra proteínas específicas de melanocitos/melanogénesis como gp100/HMB45, Melan-A/MART-1, tirosinasa y proteína tipo 1 y 2 relacionada a tirosinasa (TyrP1/2) y Mitf son útiles para identificar tumores de estirpe melanocítica, para visualizar la extensión completa en el melanoma primario o para identificar células aisladas de melanoma en biopsias de ganglio centinela. Los anticuerpos vimentina y S-100 se encuentran virtualmente en todas las lesiones melanocíticas.¹⁴ (melanomas y nevus melanocíticos). La proteína S-100 presenta una alta sensibilidad para lesiones melanocíticas (95% en melanomas primarios y metastáticos). La proteína S-100 asociada al receptor de factor de crecimiento p75 es de gran utilidad para el diagnóstico de melanomas desmoplásicos. En los melanomas metastáticos los anticuerpos del tipo MRP, como el HMB-45, aumentan la sensibilidad del diagnóstico. El HMB-45 es un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo asociado con una glucoproteína premelanosómica^{14,34}.

El melanoma amelanico se ha descrito en el 1.8 %³⁴ en general, es una forma nodular de lesión apigmentada desde el principio, más frecuente en extremidades y con peor pronóstico inicialmente por la dificultad del diagnóstico. Los melanomas amelanoticos representan en nuestra serie el 5% de los casos, en los cuales se realizaron estudios de Inmunohistoquímica con HMB 45 y Melan A y S-100. De los casos a estudio estos pertenecían a Melanoma Lentigo Acral y Melanoma Nodular.

6. CONCLUSIONES

1. La incidencia de melanoma en el INCAN(Instituto nacional del cancer) es de 5.5 por cada mil habitantes, con un rango de edad de 61-65 años, una edad media en el sexo masculino de 61 años y en el sexo femenino de 57 años y un ligero incremento en el sexo femenino (53.54%).
2. La localización anatómica mas frecuente de melanoma en nuestra serie es el miembro inferior con el 71 %, observándose su relación con el Melanoma Lentiginoso Acral (59%) que se presento con mayor frecuencia.
3. El espesor de Breslow fue en el 59 % de los casos mayor de 1 mm.
4. La determinación de la mutación del gen BRAF V600E se encontró en un 6% .
5. De los casos que presentaron mutación del Gen BRAF se encontró que el 60 % eran melanomas nodulares , 20 % melanomas de extensión superficial y 20 % melanomas mucosos.
6. No se encontró la mutación del Gen BRAF V600E en el Melanomas Lentiginosos Acrales.

7. BIBLIOGRAFIA

1. **Abdel-Malek Z**, Scott MC, Suzuki I, et al. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res.* 2000;13 Suppl 8:156-62.
2. **Acosta A.** et al. Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología, *Rev Asoc Col Dermatol.* Volumen 17, número 2, junio de 2009, pág. 87, 108. *Rev Asoc Col Dermatol*
3. **Alla V.**Engelmann D. Niemetz A. Pahnke J et al. E2f1 in Melanoma progression and metastasis *J Natl Cancer Inst.* 2010;102;127-133.
4. **Almeida de, LS**, Requena L, Rutten A, Kutzner H, Garbe C, PestañaD, Gomes MM Desmoplastic Malignant melanoma: a clinicalpathologic analysis of 133 cases. *Am J Dermatopatholo.* 2008; 30:207-15.
5. **Bastiaens MT**, Ter Huurne JA, Kielich C, et al. Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. *Am J Hum Genet.* 2001;68:884-94.
6. **Blessing K**, Sanders DS, Grant JJ Comparison of immunochemical staining of the novel antibody melan A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology* 1998;32:139-146.
7. **Bertram CG**, Gaut RM, Barrett JH, et al. An assessment of a variant of the DNA repair gene XRCC3 as a possible nevus or melanoma susceptibility genotype. *J Invest Dermatol.* 2004;122:429-32.
8. **Berwick M.** Epidemiology. Current trends, risk factors, and environmental concerns. En: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S, editors. *Cutaneous melanoma.* 3rd ed. St. Louis: QMP 1998; p. 551-71.
9. **Bishop DT**, Demenais F, Goldstein AM, et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:894-903.
10. **Bishop P.W.**, Menasce L.P., Yates A.J., et al: An immunophenotypic survey of malignant melanomas. *Histopathology* 1993; 23:159-166.
11. **Box NF**, Duffy DL, Chen W, et al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet.* 2001;69:765-73.
12. **Bravo M.** Atlas de Histología Vegetal y Animal. 2009.
<http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/3-parafina.php>
13. **Busam K.J.**, Jungbluth A.A.: Melan-A. A new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol* 1999; 6:12-18.
14. **Calonje E**, Brenn T, Lazar A, Mckee P. Mckee`s Pathology of Skin, with clinical correlations, Fourth Edition, Chapter 26, Melanoma. Vol. II Pag . 1221.
15. **Celta el.**, Genealogía,historia,antropologia .
www.amazings.com/ciencia/noticias/211107d.html.
16. **Clark WH**, Elder DE, Guerry D, Epstein M, Greene MD, Van Horn M. A Study of tumor progress. the precursor of superficial spreading and nodular melanoma . *Hum Pathol* 1984, 15: 1147-1165.
17. **Coleman W.** Tsogalis G. Molecular Pathology. Editorial ELSEVIER inc. 2009 chapter 26, 539-544.

18. **Curtis** JA, Fridlyand J, Kageshita T, Klaus J, Kutzner H, Cho K, Bastian B. Distinct sets of Genetic alterations in Melanoma. *N Engl J Med* 2005;353;20:2135-214757.
19. **Curtin** J.A, Busam K, Pinkel D, Bastian B.C.. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*, 24 (2006), pp. 4340–4346.
20. **Dalton** R. When two tribes go to war
p500 <http://www.nature.com/nature/journal/v430/n6999/#nf>
21. **Denninghoff** V., Falco J., Curutchet H., Elsner B. .Utilidad-clinica-del estudio-de la enfermedad-minima residual en-el melanoma *Medicina(B.Aires)* v.66 n.2 BuenosAires mar./abr. 2006
www.biocancer.com/journal/293/3-7.
22. **Duan** Z, Shen H, Lee JE, et al. DNA repair gene XRCC3 241Met variant is not associated with risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:1142-3.
23. **Elder** D. Lever's, HISTOPATHOLOGY OF THE SKIN, tenth edition 2009 by Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 28 pag 738 to 775.
24. **Elder** D. Tumorigenic Melanocytic Proliferations. Consultant pathology series. Demos Medical publishing, 2010.
25. **Fecher** LA, S.D. Cummings, M.J. Keefe, R.M. Alani. Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol*, 25 (2007), pp. 1606–1620.
26. **Ford** D, Bliss JM, Swerdlow AJ, et al. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer.* 1995;62:377-81.
27. **Flaherty** KT. New molecular targets in melanoma. *Curr Opin Oncol*, 16 (2004), pp. 150–154.
28. **Funk** JO, Schiller PI, Barrett MT, Wong DJ, Kind P, Sander CA. p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma. *J Cutan Pathol.* 1998;25:291-6.
29. **Gillanders** E, Juo SH, Holland EA, et al. Localization of a novel melanoma susceptibility locus to 1p22. *Am J Hum Genet.* 2003;73:301-13.
30. **González** V M. Genes de predisposición al melanoma. *Melanoma Familiar.* Servicio de Dermatología, Hospital Aleman, Argentina, agosto/2010.
31. **Glendening** JM, Flores JF, Walker GJ, et al. Homozygous loss of the p15INK4B gene (and not the p16INK4 gene) during tumor progression in a sporadic melanoma patient. *Cancer Res.* 1995;55:5531-5.
32. **Goldstein** AM, Chidambaram A, Halpern A, et al. Rarity of CDK4 germline mutations in familial melanoma. *Melanoma Res.* 2002;12:51-5.
33. **Grover** R, Chana JS, Wilson GD, Richman PI, Sanders R. An analysis of p16 protein expression in sporadic malignant melanoma. *Melanoma Res.* 1998;8:267-72.
34. **Grupo** Español multidisciplinario de Melanoma. <http://www.groupgem.org>
35. **Haluska** FG, Hodi FS. Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.*
36. **Herrera** N., Yasmín A., Flores A. Melanoma en Mexico. *Revista de Especialidades Medico quirurgicas* Vol 15, No 3, julio-septiembre 2010: 161-164.
37. **Hocker** TL, Singh MK, Tsao H, Melanoma Genetic and Therapeutic approaches in the 21th century: moving from the benchside to the bedside. *J.Invest Dermatol* 2008;128:2575-2595.

38. **Hunt** G, Kyne S, Wakamatsu K, Ito S, thody AJ. Nle4Dphe7 alpha-melanocyte-stimulating hormone increases the eumelanin: phaeomelanin ratio in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol.* 1995;104:83-5.
39. **Hussussian** CJ, Struewing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet.* 1994; 8:15-21.
40. **Instituto** Nacional de Cancerología .INCAN Registro de Cáncer en Guatemala, Unidad de estadística 2006-2010. Registro de Mortalidad por Cáncer. <http://regcangua.zzl.org/>
41. **Instituto** Nacional de Dermatología y cirugía de la piel INDERMA. <http://www.indermaguatemala.com/>
42. **Kanetsky** PA, Swoyer J, Panossian S, Holmes R, Guerry D, Rebbeck TR. A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. *Am J Hum Genet.* 2002;70:770-5.
43. **Kennedy** C, Ter Huurne J, Berkhout M, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol.* 2001;117:294-300.
44. **Kumar** V. Abbas A. Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. Octava Editorial ELSEVIER 2010. Cap. 25 pag. 1166 a 1167-1171 a 1175 .
45. **Langley** RGB et al. Clinical characteristics, in *Cutaneus Melanoma*, 3d ed, edited by CM Balch, ASN Houghton, AJ Sober, SJ Soong, Qualyti Medical, 1998, pp 81-101.
46. **Lavanderos** J. Pérez J. Jeria S. “Actualizaciones en melanoma maligno cutáneo”, *Cuad. Cir.* 2010; 24: 47-56, mingaonline.uach.cl/pdf/cuadcir/v24n1/art08.pdf.
47. **López**, F,Angulo, B,Gomez B. Comparison of Molecular Testing Methods for the Detection of BRAF V600E Mutations in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, Specimens of Malignant Melanoma. www.dianasterapeuticas.com
48. **Luca** M, Xie S, Gutman M, Huang S, Bar-Eli M. Abnormalities in the CDKN2 (p16INK4/MTS-1) gene in human melanoma cells: relevance to tumor growth and metastasis. *Oncogene.* 1995;11:1399-402.
49. **Marini** M.Minaudo C.Melanoma. *Dermatologia-Iberoamericana* on line. CAPITULO 99 Melanoma PIEL-Latinoamericana - Libreria.mht 20/01/2011.
50. **Marti** RN, Sorolla A, Yeramian A. New Therapeutic Targets in Melanoma, *Actas Dermo-sifologicas*, vol 103, Issue 7. Sept 2012 pages 579-590.
51. **Matichard** E, Verpillat P, Meziani R, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants may increase the risk of melanoma in France independently of clinical risk factors and UV exposure. *J Med Genet.* 2004;41:e13.
52. **Monzon** J, Liu L, Brill H, et al. CDKN2A mutations in multiple primary melanomas. *N Engl J Med.* 1998;338:879-87.
53. **Nathanson**, K.L.. Using genetics and genomics strategies to personalize therapy for cancer: focus on melanoma. *Biochem Pharmacol*, 80 (2010), pp. 755–761.
54. **Mikller** AJ, Mihm MC. Mechanisms of disease Melanoma. *N. Engl Med* 2006, 355: 51-65.
55. **Nelson** AA. Tsao H, Melanoma and Genetics. *Clin Dermatol* 2009;27:46-52.
56. **Nonaka** D., Chiriboga L., Rubin B.P. Differential expression of S100 protein subtypes in malignant melanoma, *J Cutan Pathol* 2008; 35:1014-1019.
57. **Orosz** Z.: Melan-A/MART-1 expression in various melanocytic lesions and in non-melanocytic soft tissue lesions. *Histopathology* 1999; 34:517-525.

58. **Orlow JS.** The biogenesis of melanosomas. En: Nordund LL, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP, editors. The pigmentary system: physiology and pathophysiology. New York: Oxford University Press; 1998. p. 97-106.
59. **Palmer JS, Duffy DL, Box NF, et al.** Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J HumGenet.* 2000;66:176-86.
60. **Piepkorn M.** Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:705-22.
61. **Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, et al.** The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell.* 1998;92:713-23.
62. **Radhi J.M.:** Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16, and Bcl-2: expression in benign versus malignant components. *J Cutan Med Surg* 1999; 3:293-297.
63. **Rapini, R.** Practical Dermatopathology, first edition ,Editor Elsevier Mosbi, 2005 -273-279.
64. **Reed J.A., Loganzo F., Shea C.R., et al:** Loss of expression of the p16/cyclin dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stages of tumor progression. *Cancer Res* 1995; 55:2713-2718.
65. **Reinke S., Koniger P., Herberth G., et al:** Differential expression of MART-1, tyrosinase, and SM5-1 in primary and metastatic melanoma. *Am J Dermatopathol* 2005; 27:401-406.
66. **Rizos H, Puig S, Badenas C, et al.** A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF. *Oncogene.* 2001;20:5543-7.
67. **Robert J.** Friedman, MD; Darrell S. Rigel, MD; Alfred W. Kopf, MD; David Polsky, MD, PhD Skin Cancer Foundation. [http://skincancer.ar.com/index.phpABCD melanoma](http://skincancer.ar.com/index.phpABCD%20melanoma)
68. **Roche. cobas® 4800 BRAF V600 Mutation,** [molecular.roche.com/assays/Pages/cobas4800 BRAF V600 MutationTest.aspx](http://molecular.roche.com/assays/Pages/cobas4800%20BRAF%20V600%20MutationTest.aspx).
69. **Rother J, Jones D.** Molecular markers of tumor progression in melanoma, *Current Genomics*, 10 (2009), pp. 231–239.
70. **Ruiz A, Puig S, Malvehy J, et al.** CDKN2A mutations in Spanish cutaneous malignant melanoma families and patients with multiple melanomas and other neoplasia. *J Med Genet.* 1999;36:490-3.
71. **Rouzaud F, Kadekaro AI, Abel Malek ZA, Hearing VJ,** MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res* 2005;571:133-152.
72. **Saldivar, C.**et al. Melanoma Acral Lentiginoso. *Rev Inst Nal Cancerol Méx* 1998; 44(4) : 210-215.
73. **Smith R, Healy E, Siddiqui S, et al.** Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J Invest Dermatol.* 1998;111:119-22.
74. **Straume O, Akslen LA.** Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 1997;74:535-9.
75. **Sturm RA.** Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link. *Melanoma Res.*2002;12:405-16.
76. **Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T.** Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer.* 1997;74:255-9.

77. **Takata** M.Saida T. Genetic alterations in melanocytic tumors, Department of Dermatology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan. *Journal of Dermatological Science*. Vol 43. Jul 2006.
78. **Thomas** NE,Kanestky PA, Begg CB, Melanoma Molecular, subtypes: unifying and paradoxical result. *J. Invest Dermatol* 2010;130:12-14.
79. **Valverde** P, Healy E, Sikkink S, et al. The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet*. 1996;5:1663-6.
80. **Vanbroecklin** M. Verhaegen M. Soengas M. Cancer Res. Mitogen-Activated Protein Kinase inhibition Induces Translocation of Bmf to promote Apoptosis in Melanoma. 2010 march 1.
81. **Van der Velden** PA, Sandkuijl LA, Bergman W, et al. Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies melanoma risk in Dutch families with melanoma. *Am J Hum Genet*. 2001;69:774-9.
82. **Winsey** SL, Haldar NA, Marsh HP, et al. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res*. 2000;60: 5612-6.
83. **Wistuba** I. Aplicaciones de la biología molecular en anatomía patológica *Rev. méd. Chile* v.129 n.7 Santiago jul. 2001.
84. **Xu** X, Thornwal M, Lundin LG, Chhajlani V. Val92Met variant of the melanocyte stimulating hormone receptor gene. *Nat Genet*. 1996;14:384.
85. **Yamamoto** O, Bhawan J. Three modes of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pigment Cell Res*. 1994;7:158-69.
86. **Zuo** L, Weger J, Yang Q, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet*. 1996;12:97-9.

8. ANEXOS

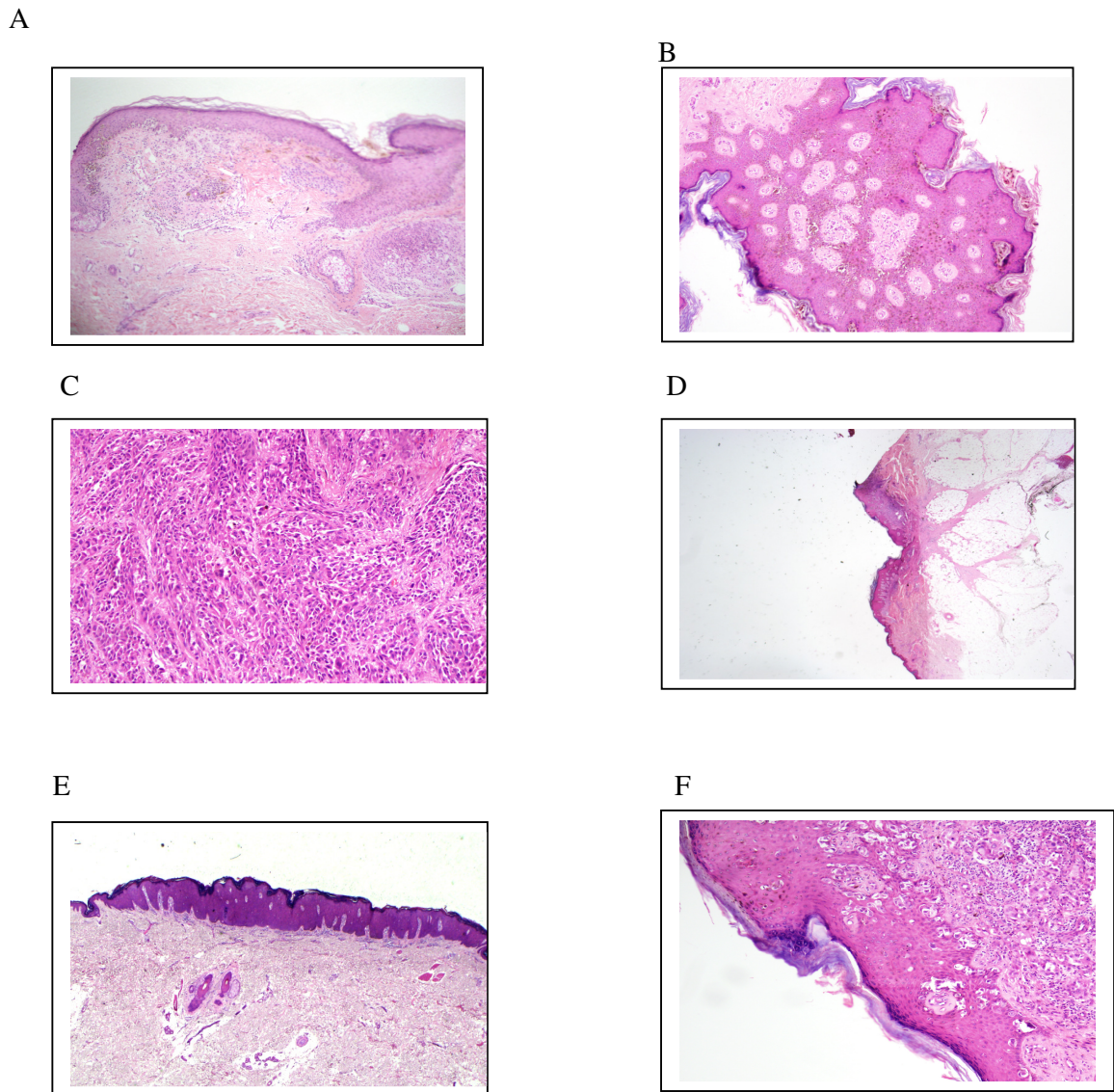


Figura 8.1
Cortes histológicos de diferentes tipos de Melanomas con colación de H & E. A y B, Melanoma de Extensión Superficial. C. Melanoma Lentiginoso Acral Amelanotico. D. Melanoma Extensión Superficial. E y F. Melanoma Lentiginoso Acral .

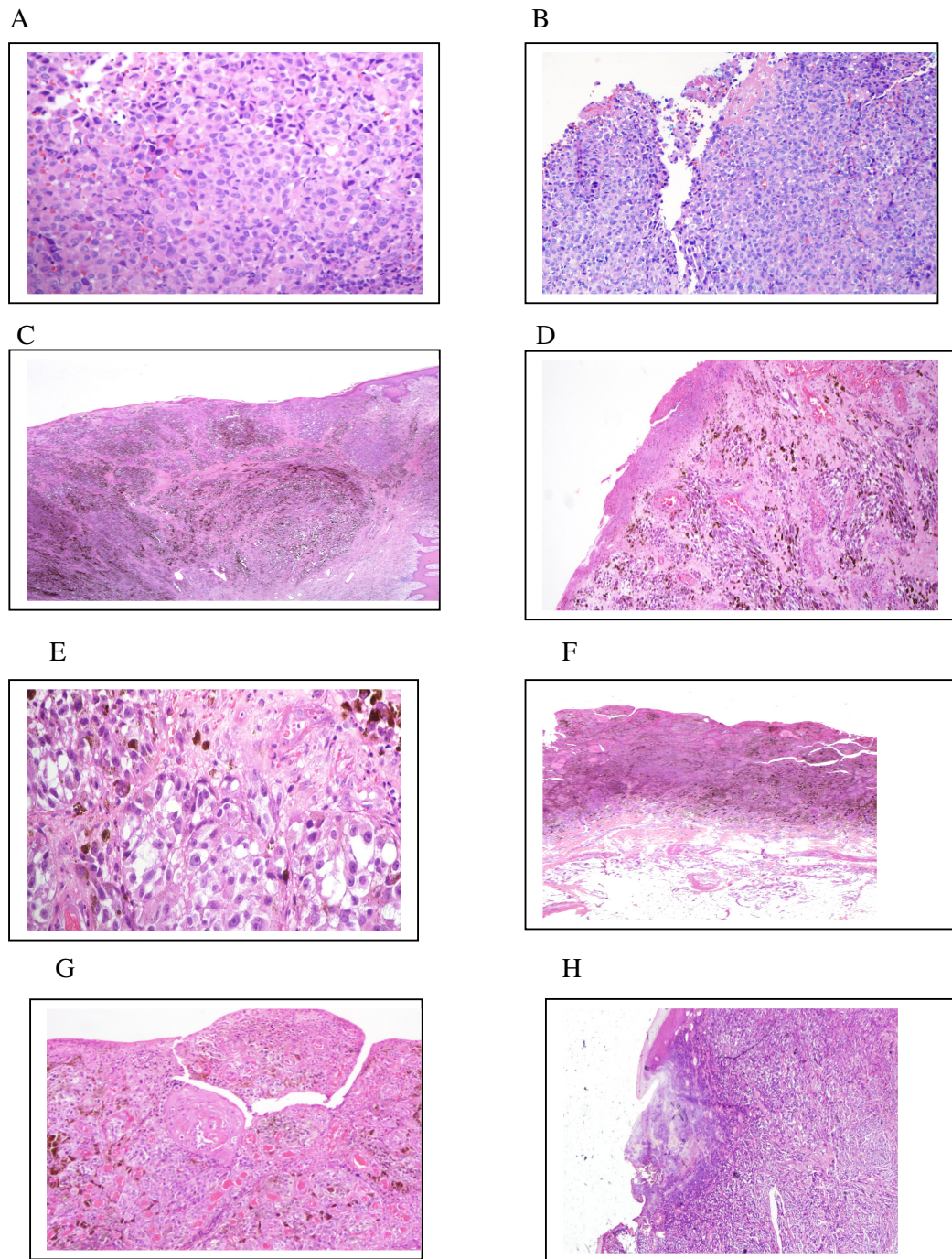


Figura 8.2
Cortes histológicos con diagnostico de Melanoma Lentiginoso Acral . A,B,C,D,E,F,G.
con colación
de H & E.

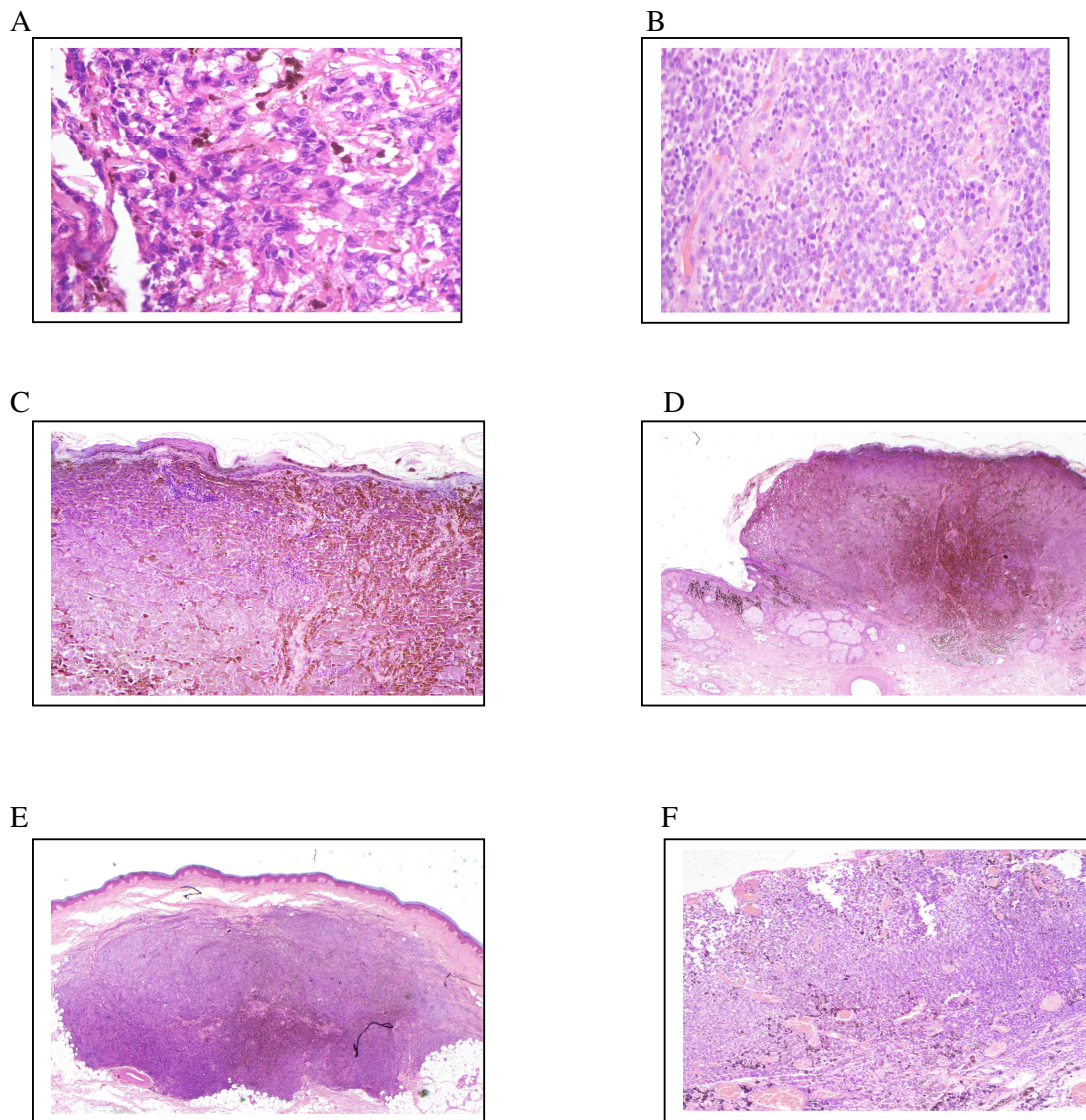


Figura 8.3
Cortes histológicos de diferentes pacientes con colación de H & E. A y B: Melanoma
Lentigo Acral. C , D , E, F, Melanoma Nodular.

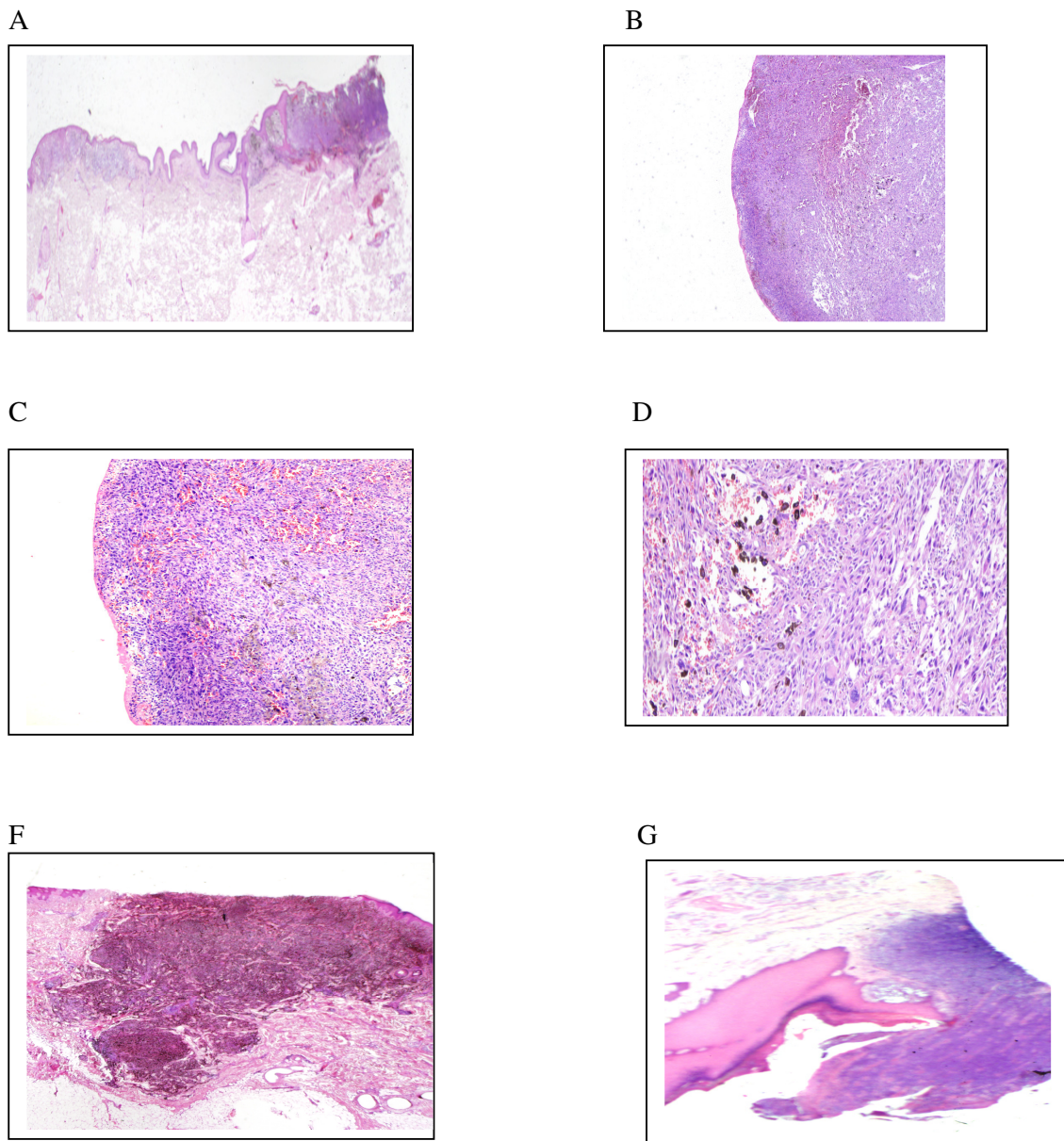


Figura 8.4
Cortes histológicos de diferentes pacientes, A,B,C,D con diagnostico de Melanoma Nodular, E : Melanoma Lentigo Acral amelanotico , con colación de H & E.

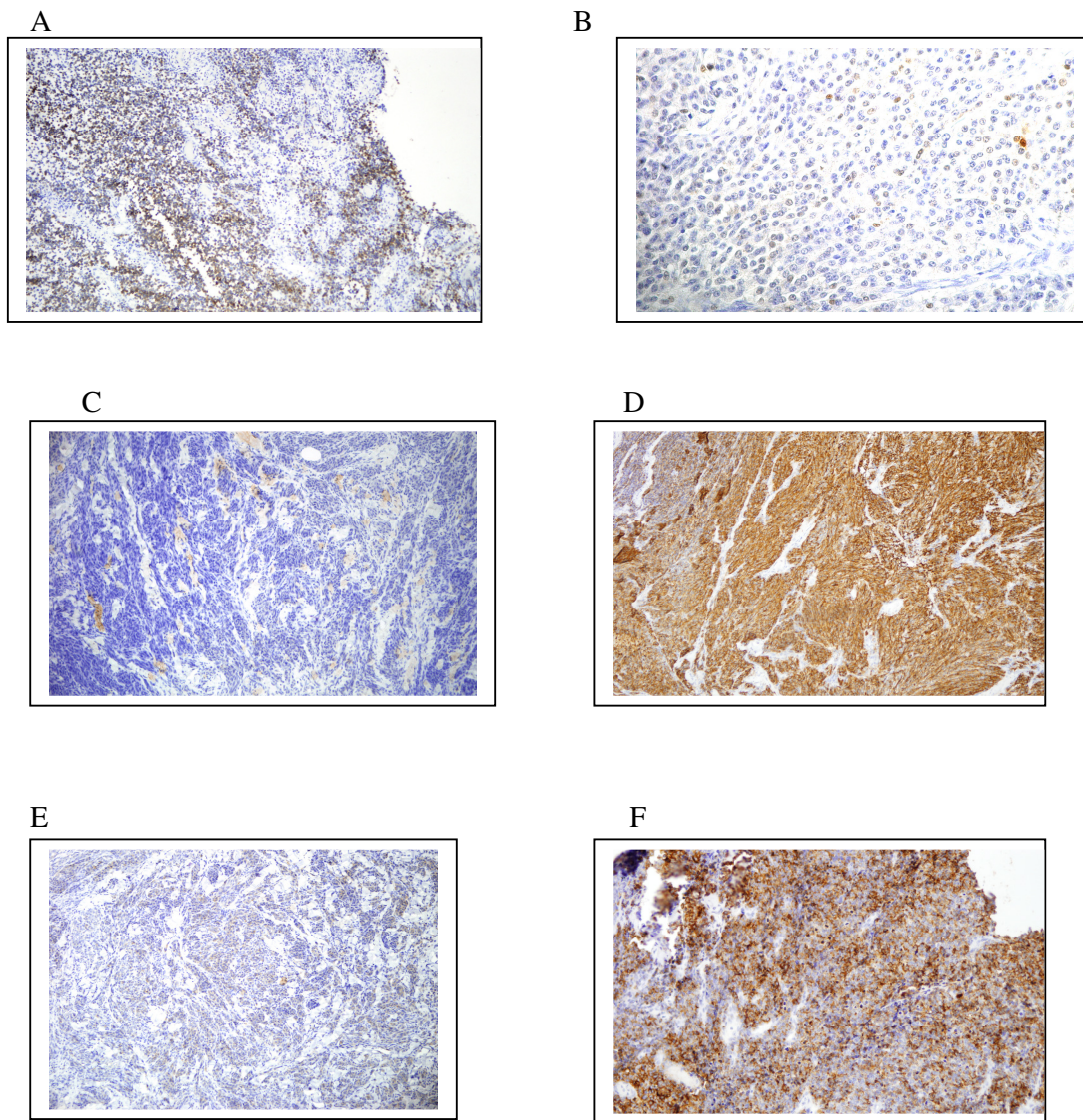


Figura 8.5
Cortes histológicos de Melanomas amelanoticos con Tinción de Inmunohistoquímica. A
Melan A . B. S100. C y D HMB 45. E Melan A. E HMB45.

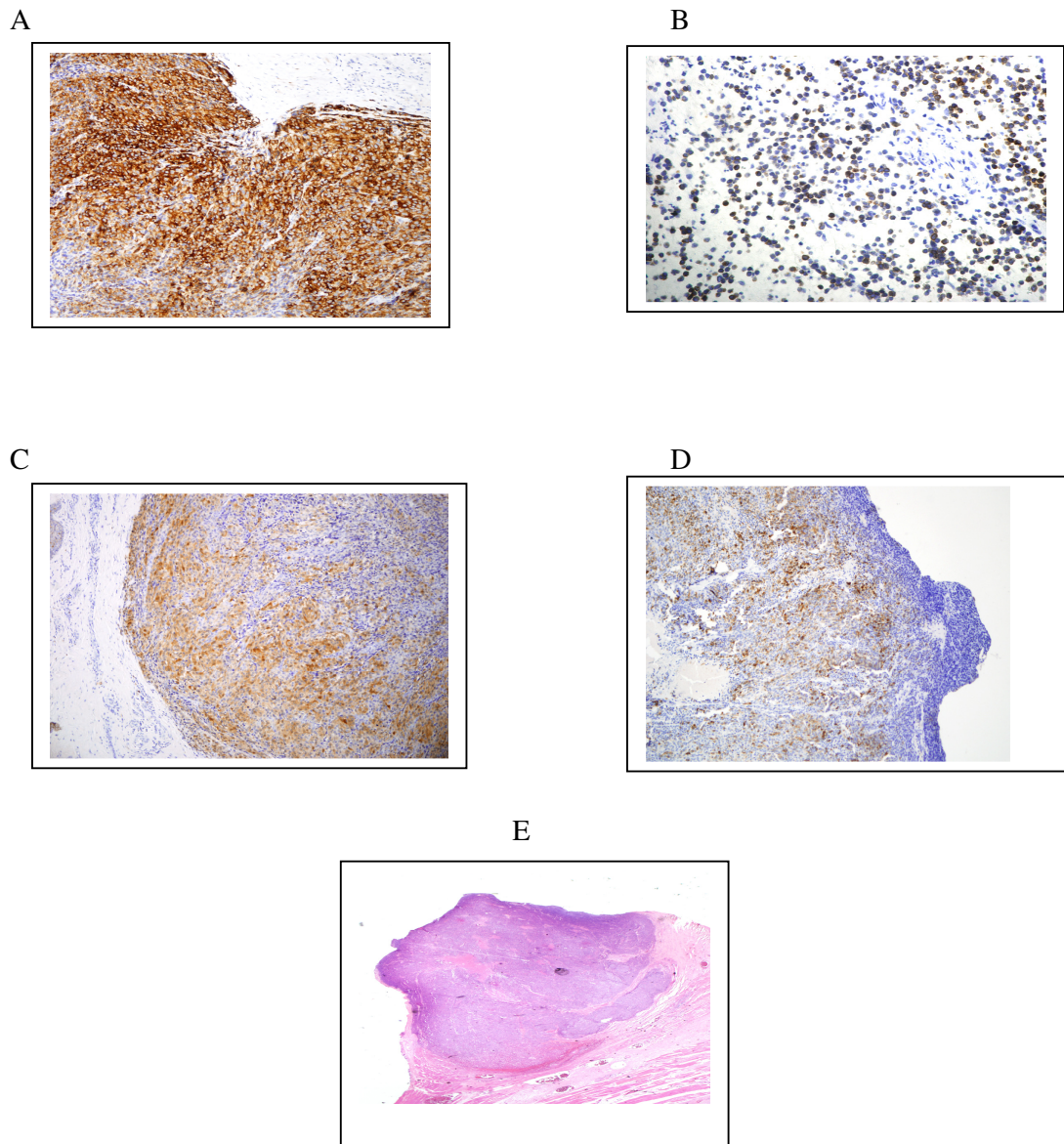


Figura 8.6
Cortes histológicos de Melanoma Lentiginoso Acral y Melanoma Nodular amelanoticos
con Tinción de Inmunohistoquímica. A :HMB 45. B :Melan A . C: S-100. D: Melan A.
E: Melanoma amelanotico con H & E.